

Aus der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle der Mcp-1/Ccl2-abhängigen Rekrutierung von
Makrophagen in der Progression der chronischen
Niereninsuffizienz, dargestellt am Beispiel der diabetischen
Nephropathie und des Alport-Syndroms in der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Sebastian Clauß

aus München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus G. Parhofer

1. Mitberichterstatte: Prof. Dr. med. Manfred Haslbeck

2. Mitberichterstatte: Priv.-Doz. Dr. med. Lutz T. Weber

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2006 bis November 2008 in der Abteilung für Klinische Biochemie in der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt.

(Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke)

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Danksagung

Mein bester Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung einer sehr interessanten Themenstellung, die Einführung in die Welt der Wissenschaft und die Förderung auch über die Doktorarbeit hinaus. Es war in jeder Hinsicht eine anstrengende, jedoch sehr lehrreiche Zeit, die ich nicht missen möchte.

Herrn Prof. Dr. Reincke und Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann danke ich für die Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät (FöFoLe).

Frau Dr. hum. biol. Volha Ninichuk danke ich für ihre geduldige Hilfe beim Erlernen wissenschaftlicher Methoden und die gute erfolgreiche Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich Ewa Radomska, Stephanie Pfeiffer, Patrizia Lemnitzer, Jana Mandelbaum und Dan Draganovici für ihre professionelle Hilfe danken, ohne die die vorliegende Arbeit nie hätte verwirklicht werden können.

Herrn Dipl. Pharm. Onkar Kulkarni möchte ich für seine Geduld, seine unermüdliche Hilfe und nicht zuletzt für seine stets freundliche, ruhige und besonnene Art vielmals danken.

Frau Ingrid Beyer danke ich für Ihre wertvollen Hinweise zur Durchführung histologischer Färbungen.

Herrn PD Dr. med. Holger Schmid danke ich für die Durchführung der Lasermikrodissektion.

Herrn PD Dr. med. Oliver Gross danke ich für die Überlassung der Kollagen-IV-defizienten Mäuse, die mir die Etablierung einer eigenen Zucht ermöglichten.

Herrn Dr. rer. nat. Dirk Eulberg und den Mitarbeitern der NOXXON Pharma AG danke ich für die Überlassung des Antagonisten.

Katharina Flür, Ilka Edenhofer und Peter Kurktschiev danke ich für die schöne Zeit und ihre Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit. Ich bin glücklich und dankbar für ihre Freundschaft.

Meiner lieben Ina danke ich für all ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die wunderschöne Zeit, die ich bisher mit ihr verbringen durfte.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, die mir alles ermöglicht haben, immer an mich geglaubt haben und mir in jeder Lebenslage zur Seite standen.

Aus dieser Arbeit gingen folgende Originalarbeiten hervor

1. Ninichuk V., Kulkarni O., **Clauss S.**, Anders HJ., Tubular atrophy, interstitial fibrosis, and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. An accelerated model of advanced diabetic nephropathy. Eur J Med Res, 12(8):351-5, 2007.
2. Ninichuk V.*, **Clauss S.***, Kulkarni O., Schmid H., Segerer S., Radomska E., Eulberg D., Buchner K., Selve N., Klusmann S., Anders HJ., Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice. Am J Pathol, 172(3):628-37, 2008. * *geteilte Erstantorenschaft*
3. **Clauss S.**, Gross O., Kulkarni O., Avila-Ferrufino A., Radomska E., Segerer S., Eulberg D., Klusmann S., Anders HJ., Ccl2/Mcp-1 blockade reduces glomerular and interstitial macrophages but does not ameliorate renal pathology in collagen4A3-deficient mice with autosomal recessive Alport nephropathy. J Pathol, 218(1):40-7, 2008.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden präsentiert

Vorträge

1. **Clauss S.**, *Nuklease-resistente anti-Mcp-1 Aptamere zur Therapie der diabetischen Nephropathie*, „Junge Niere“, 13. Mai 2007, Göttingen.
2. **Clauss S.**, Ninichuk V., Kulkarni O., Segerer S., Eulberg D., Buchner K., Klusmann S., Anders HJ., *Die spät begonnene Blockade von Ccl2/Mcp-1 mit RNA-Spiegelmeren verhindert die globale diabetische Glomerulosklerose und verbessert die GFR bei db/db Mäusen mit diabetischer Nephropathie*, Nephrologisches Forum München, „Fellows' Night“, 10. Juni 2007, München.

3. **Clauss S.**, *Nuklease-resistente anti-Mcp-1 Aptamere zur Therapie der diabetischen Nephropathie*, Interne Klinikfortbildung „Forschung an der Medizinischen Poliklinik“, 12. Juli 2007, München.
4. **Clauss S.**, *Die Blockade des Chemokins Mcp-1 bei der diabetischen Nephropathie*, Statusseminar des Promotionsstudiums „Systembiologische Medizin“ der Medizinischen Fakultät, 1. Juni 2008, Herrsching.

Poster

1. **Clauss S.**, *Späte Blockade von Mcp-1 mit dem pegylierten Spiegelmer mNOX-E36 verhindert die globale diabetische Glomerulosklerose und verbessert die GFR bei db/db Mäusen*, 38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie (GfN), 25. September 2007, München.
2. **Clauss S.**, Eulberg D., Selve N., Buchner K., Klusmann S., Anders HJ., *Die spät begonnene Blockade von Ccl2/Mcp-1 mit RNA-Spiegelmeren verhindert die globale Glomerulosklerose und verbessert die glomeruläre Filtrationsrate bei db/db Mäusen mit Typ 2 Diabetes*, 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), 1. April 2008, Wiesbaden.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Einleitung	11
2.1	<i>Chronische Niereninsuffizienz</i>	11
2.1.1	Definition und Epidemiologie	11
2.1.2	Diabetes mellitus und Diabetische Nephropathie	12
2.1.2.1	Diabetes mellitus	12
2.1.2.2	Diabetes-Tiermodelle	14
2.1.2.3	Diabetische Nephropathie	15
2.1.3	Alport-Syndrom	20
2.1.3.1	Epidemiologie und Genetik	20
2.1.3.2	Pathologie	22
2.1.3.3	Pathogenese	24
2.1.3.4	Therapie	27
2.1.3.5	Alport-Tiermodelle	28
2.1.4	Molekulare Mechanismen der Progression chronischer Nierenerkrankungen	29
2.1.5	Nephroprotektive Therapie	32
2.2	<i>Chemokine und Chemokinrezeptoren</i>	33
2.2.1	Einteilung	33
2.2.2	Chemokinwirkungen	36
2.2.3	MCP-1	38
2.3	<i>Spiegelmertechnologie</i>	40
2.3.1	Aptamere	40
2.3.2	SELEX	40
2.3.3	Spiegelmer	43
2.4	<i>Hypothese</i>	45
3	Material und Methoden	46
3.1	<i>Material</i>	46
3.1.1	Tierhaltung	46
3.1.2	Geräte	46
3.1.3	Chemikalien	47
3.1.4	Lösungen	49
3.1.5	Oligonukleotid-Primer und -proben für die RT-PCR	50
3.1.6	Oligonukleotid-Primer für die Genotypisierung der COL4A3 ^{-/-} -Mäuse	51
3.1.7	Software	51
3.1.8	Spiegelmer	52
3.2	<i>Methoden</i>	53
3.2.1	Tierversuche	53
3.2.1.1	Versuchstierhaltung	53
3.2.1.2	Versuchstiere	53
3.2.1.3	Studiendesign	55
3.2.1.4	Zelltransferstudie	57
3.2.2	Zellkultur	59
3.2.2.1	Zelllinien und Kulturbedingungen	59
3.2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	59
3.2.2.3	Stimulationsexperiment	60

3.2.3	Immunhistochemische Methoden und histopathologische Analyse	60
3.2.4	ELISA	61
3.2.4.1	Allgemeines	61
3.2.4.2	Bestimmung der Albuminurie	62
3.2.4.3	Bestimmung der Mcp-1-Konzentration	63
3.2.5	Kreatininbestimmung	63
3.2.6	Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)	64
3.2.7	RNA-Analyse	64
3.2.7.1	Isolierung von RNA	64
3.2.7.2	Synthese der cDNA	65
3.2.7.3	Real-time RT-PCR	65
3.2.8	Laser-Mikrodissektion	66
3.2.8.1	Grundlagen der Laser-Mikrodissektion	66
3.2.8.2	Vorbereitung	67
3.2.8.3	Durchführung	68
3.2.9	Statistische Auswertung	69
4	Ergebnisse	70
4.1	<i>Effekt der Mcp-1-Blockade bei db/db-Mäusen</i>	70
4.1.1	Rekrutierung von Makrophagen in die Niere	70
4.1.2	Körpergewicht und Blutzuckerspiegel	71
4.1.3	Differentialblutbild	72
4.1.4	Plasmakonzentration von mNOX-E36-3'PEG und Serumspiegel von Mcp-1	74
4.1.5	Anzahl glomerulärer Makrophagen und globale Glomerulosklerose	75
4.1.6	Anzahl interstitieller Makrophagen und tubulointerstitieller Schaden	79
4.1.7	Expression von Mcp-1, Ccr2 und Tgf- β bei uninephrektomierten db/db-Mäusen	82
4.1.8	Proteinurie	84
4.1.9	Proliferation von Makrophagen und Mesangialzellen	85
4.1.10	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	86
4.2	<i>Effekt der Mcp-1-Blockade bei COL4A3^{-/-}-Mäusen</i>	87
4.2.1	Rekrutierung von Makrophagen in die Niere	87
4.2.2	Körpergewicht	88
4.2.3	Serumspiegel von MCP-1	88
4.2.4	Ausscheidung von Mcp-1 im Urin	89
4.2.5	Proteinurie	90
4.2.6	Überleben	91
4.2.7	Anzahl glomerulärer Makrophagen und globale Glomerulosklerose	92
4.2.8	Anzahl interstitieller Makrophagen und tubulointerstitieller Schaden	95
4.2.9	Expression von Mcp-1 und Ccr2	96
5	Diskussion	98
5.1	<i>Effekt der Mcp-1-Blockade bei db/db-Mäusen</i>	99
5.2	<i>Effekt der Mcp-1-Blockade bei COL4A3^{-/-}-Mäusen</i>	102
5.3	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	105
6	Quellenverzeichnis	106
7	Abkürzungen	117
8	Lebenslauf	121

1 Zusammenfassung

Inzidenz und Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz nehmen weltweit zu. Steigende Morbidität und Mortalität gehen mit geringerer Lebensqualität einher, was neue Therapien zur Verlangsamung der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz aus gesellschaftlichen, volkswirtschaftlichen und vor allem medizinischen Gründen erforderlich macht. Chemokine und Chemokinrezeptoren sind an der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen beteiligt. Sie regulieren die Rekrutierung von Lymphozyten und Makrophagen und lösen so eine Entzündungsreaktion aus. Eingewanderte Leukozyten sezernieren ihrerseits profibrotische und proinflammatorische Zytokine, die die Entzündungsreaktion aufrecht erhalten, zu Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose und Tubulusatrophie führen und so zur Progression beitragen. Chemokine und Chemokinrezeptoren stellen damit mögliche Zielmoleküle dar, deren therapeutische Blockade die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz verlangsamen könnte.

Mit der vorliegenden Studie wurde am Beispiel der diabetischen Nephropathie und der Nephropathie beim Alport-Syndrom die Rolle des Chemokins *macrophage chemoattractant protein-1* (Mcp-1) bei der Progression der chronischen Niereninsuffizienz untersucht, da es die damit assoziierte Rekrutierung von Makrophagen in die Niere vermittelt und in Korrelation zum Erkrankungsstadium verstärkt exprimiert bzw. verstärkt im Urin ausgeschieden wird. Mcp-1-defiziente diabetische Mäuse zeigen zudem eine verlangsamte Progression. Eine therapeutische Blockade von Mcp-1 sollte daher die Infiltration von Makrophagen reduzieren und mit geringerer Nierenschädigung einhergehen.

Mcp-1 wurde bei uninephrektomierten db/db-Mäusen mit fortgeschrittener diabetischer Nephropathie und bei Kollagen-IV- α_3 -defizienten Mäusen mit autosomal-rezessiver Alport-Nephropathie mit einem neuartigen Antagonisten, dem Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG blockiert. Spiegelmere sind L-enantiomere Aptamere, die aufgrund ihrer besonderen chemischen Struktur resistent gegen enzymatischen Abbau sind. Durch Behandlung mit dem Spiegelmer konnte die Mcp-1-vermittelte Rekrutierung von *ex vivo* markierten und Spendertieren injizierten Monozyten in das glomeruläre und tubulointerstitielle Kompartiment der Niere signifikant reduziert werden, was die Wirkung von mNOX-E36-3'PEG *in vivo* bestätigte und die Rationale für die Verwendung des Spiegelmers in der vorliegenden Studie lieferte.

Männliche uninephrektomierte db/db-Mäuse erhielten ab einem Alter von 5 Monaten dreimal wöchentlich das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG, das unwirksame Kontrollspiegelmer PoC-PEG oder 5%-Glukose. Die achtwöchige Behandlung führte bei den Spiegelmer-behandelten Tieren zu einer Reduktion der glomerulären Makrophagen um 40 % und der tubulointerstitiellen Makrophagen um 53 % verglichen mit den Tieren, die das Kontrollspiegelmer PoC-PEG erhielten. Dies war assoziiert mit einer signifikanten Reduktion glomerulärer und tubulointerstitieller Schäden sowie einer Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate (GFR).

Daneben konnte die Expression von Mcp-1 und Ccr2 in der Niere signifikant reduziert werden. Kollagen-defiziente Mäuse erhielten ab einem Alter von 3 bzw. 6 Wochen dreimal wöchentlich das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG, das unwirksame Kontrollspiegelmer PoC-PEG oder 5%-Glukose. Die sechs- bzw. dreiwöchige Behandlung führte bei den Spiegelmer-behandelten Tieren zu einer Reduktion der glomerulären Makrophagen um 50 % und der tubulointerstitiellen Makrophagen um 30 %. Dies war jedoch weder mit einer Reduktion der Nierenschädigung oder der Expression von Mcp-1 und Ccr2, noch mit einer Verlängerung des Überlebens assoziiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die spät begonnene therapeutische Blockade von Mcp-1 durch das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG bei der db/db-Maus einen Schutz vor Glomerulosklerose bietet, die tubulointerstitielle Schädigung reduziert und die Nierenfunktion verbessert. Die Therapie mit anti-Mcp-1-Spiegelmeren könnte demnach das derzeitige Behandlungsregime der Diabetes-assoziierten chronischen Niereninsuffizienz um einen neuen Therapieansatz ergänzen und so die Progression verlangsamen. Beim Alport-Syndrom konnte die therapeutische Blockade von Mcp-1 durch das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG nicht vor Glomerulosklerose schützen, die tubulointerstitielle Schädigung nicht reduzieren, die Nierenfunktion nicht verbessern und das Überleben nicht verlängern. Ein Einfluss auf die Progression des Alport-Syndroms konnte nicht nachgewiesen werden. Die Therapie mit anti-Mcp-1-Spiegelmeren bietet demnach keine zusätzliche Behandlungsoption bei der hereditären Alport-Nephropathie.

2 Einleitung

2.1 Chronische Niereninsuffizienz

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Unter chronischer Niereninsuffizienz versteht man den über Monate bis Jahre fortschreitenden Funktionsverlust der Niere bis zum terminalen Nierenversagen aufgrund einer chronischen Nierenerkrankung, etwa der diabetischen Nephropathie. Die *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)* der US-amerikanischen *National Kidney Foundation* definiert die chronische Niereninsuffizienz als Abnahme der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73 m² Körperoberfläche oder als histopathologisch bzw. laborchemisch gesicherte Nierenschädigung für mindestens 3 Monate [112] und teilt sie in fünf Stadien ein (Tabelle 1).

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz [112].

<u>Stadium</u>	<u>GFR</u> <u>(ml/min/1,73 m²)</u>	<u>Prävalenz</u>	<u>Vorgehen</u>
1 Nierenschädigung mit normaler GFR	>90	3,3 %	Diagnosestellung und Therapie der Grunderkrankung
2 Nierenschädigung mit gering reduzierter GFR	60-90	3,0 %	Verlangsamung der Progression
3 mäßig reduzierte GFR	30-60	4,3 %	Behandlung der Komplikationen
4 stark reduzierte GFR	15-30	0,2 %	Vorbereitung für die Nierenersatztherapie
5 Nierenversagen	<15	0,1 %	Nierenersatztherapie

Inzidenz und Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz steigen weltweit stark an und haben sich in den letzten 10 Jahren annähernd verdoppelt. Allein in den USA gibt es etwa 8 Millionen Patienten mit chronischer Insuffizienz im Stadium III und IV, was etwa 4,5 % der Gesamtbevölkerung entspricht. Etwa 325.000 Patienten mit terminalem Nierenversagen erhalten eine Nierenersatztherapie [135].

Schon heute ist die häufigste Ursache des terminalen Nierenversagens die diabetische Nephropathie (Abbildung 1). Die WHO geht für das Jahr 2010 allein für Deutschland von etwa 10 Millionen Diabetikern aus [237], von denen etwa ein Drittel eine diabetische Nephropathie entwickeln wird [2, 101]. Eine weitere Zunahme chronisch niereninsuffizienter Patienten mit allen gesellschaftlichen und volkswirtschaftlichen Folgen ist daher anzunehmen.

Die Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten zur Verlangsamung der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz ist daher von wesentlicher Bedeutung.

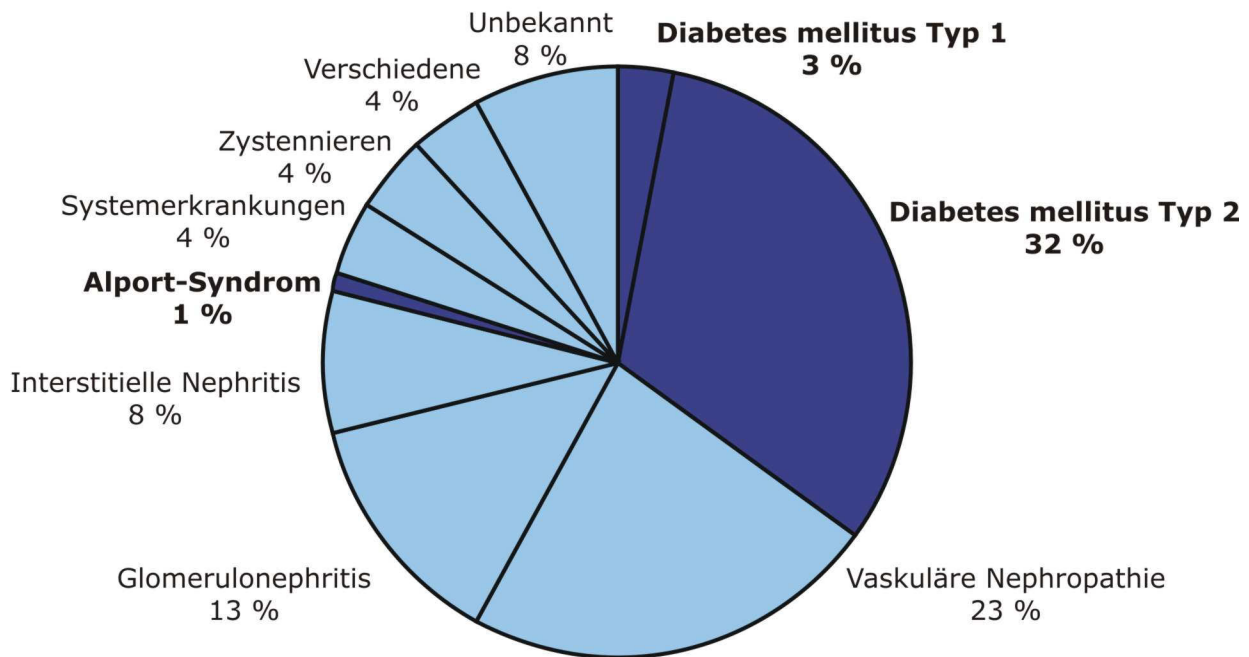


Abbildung 1: Ursachen des terminalen Nierenversagens in Deutschland [66].

2.1.2 Diabetes mellitus und Diabetische Nephropathie

2.1.2.1 Diabetes mellitus

Im Jahre 100 n. Chr. beschreibt der griechische Arzt Aretaios von Kappadokien eine „rätselvolle Krankheit“ mit gesteigertem Harnfluss bei starkem Durstempfinden, die zu raschem Tod der Erkrankten führt. Es handelte sich dabei um die erste detaillierte Beschreibung des Diabetes mellitus (griech. „*honigsüßer Durchfluss*“). Unter Diabetes mellitus versteht man heute verschiedene chronische Stoffwechselerkrankungen mit einem gemeinsamen charakteristischen Befund, dem erhöhten Blutzuckerspiegel. Entsprechend der Ätiologie teilt die WHO den Diabetes mellitus in vier Gruppen ein (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (nach [3]).

I	Typ 1 Diabetes
II	Typ 2 Diabetes
III	Andere spezifische Diabetes-Typen (A-H, z.B. Erkrankungen des exokrinen Pankreas)
IV	Gestationsdiabetes

Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich meist im Kindes- und Jugendalter und zeigt eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen des endokrinen Pankreas, meist aufgrund einer Autoimmunreaktion. Durch den resultierenden absoluten Insulinmangel und der daraus folgenden ketoazidotischen Stoffwechsellage ist die Behandlung mit Insulin für die Betroffenen lebensnotwendig. Dem wesentlich häufigeren Diabetes mellitus Typ 2 liegt dagegen eine gestörte Insulinsekretion und Insulinresistenz, d.h. eine herabgesetzte Insulinwirkung, zugrunde. Diese Form des Diabetes entwickelt sich meist aufgrund falscher Ernährung und Übergewicht langsam über mehrere Jahre und resultiert in einem relativen Insulinmangel, der eine Insulintherapie anfangs nicht erfordert. Daneben existieren noch weitere, sehr seltene Formen des Diabetes mellitus sowie der ausschließlich im Rahmen einer Schwangerschaft auftretende Gestationsdiabetes.

Wird der Diabetes mellitus nur unzureichend behandelt, kommt es im Verlauf von mehreren Jahren zur progredienten Schädigung der Blutgefäße. Im Rahmen einer Makroangiopathie kommt es zur Arteriosklerose größerer Gefäße mit zunehmender Stenose und damit einhergehender ischämischer Schädigung etwa des Herzens, des Gehirns oder der Beinarterien. Die Folgen sind Herzinfarkt, Schlaganfall und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Daneben entwickelt sich eine diabetesspezifische Mikroangiopathie. An der Netzhaut führt die Mikroangiopathie zur Bildung von Mikroaneurysmen und zur Neubildung von anomalen Gefäßen, die ihrerseits zu intraretinalen oder intravitrealen Einblutungen sowie zur Entstehung eines Makulaödems führen. Durch diese diabetische Retinopathie, die nach 15 Jahren etwa bei 90 % aller Typ 1 Diabetiker und bei 25 % aller Typ 2 Diabetiker auftritt, droht den Betroffenen die Erblindung. Nach etwa zehnjähriger Diabetesdauer stellt sich aufgrund Schädigung der Vasa nervorum bei der Hälfte aller Erkrankten eine diabetische Neuropathie ein. Die Patienten leiden unter Polyneuropathie mit Parästhesien der Beine, verminderter Thermosensibilität und reduziertem Schmerzempfinden. Daneben entwickelt sich eine Neuropathie des autonomen Nervensystems mit verminderter Herzfrequenzvariabilität, Motilitätsstörung des Magen-Darm-Trakts oder erektiler Dysfunktion. Infolge einer zunehmenden Schädigung renaler Gefäße kommt es außerdem zur so genannten diabetischen Nephropathie.

2.1.2.2 Diabetes-Tiermodelle

Unerlässlich für die Erforschung von Krankheiten sind geeignete Tiermodelle. Die meisten Tiermodelle existieren für die Maus. Die Vorteile der Mausmodelle sind das vollständig entschlüsselte Genom, die geringen Anschaffungs- und Unterhaltskosten, geringer Platzbedarf und kurze Reproduktionszyklen.

Mausmodelle für den Typ-1-Diabetes sind das „*Insulin-2 Akita*“-Modell, bei dem durch eine autosomal-dominante Mutation fehlgefaltetes Insulin entsteht, das selektiv die β -Zellen des Pankreas zerstört oder das Modell der „*Nonobese Diabetic Mouse (NOD)*“, bei dem es durch eine Autoimmunreaktion zur Zerstörung der β -Zellen kommt. Am häufigsten findet jedoch das Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus Anwendung, bei dem durch mehrmalige Gabe des β -Zell-toxischen Streptozotocin eine Zerstörung der Inselzellen im Pankreas induziert wird [23].

Für den Typ-2-Diabetes stehen weitere Mausmodelle zur Verfügung, etwa das Modell der hyperinsulinämischen ob/ob-Maus, der New Zealand obese Maus, der Kkay-Maus oder der hypoinsulinämischen non-obese Maus. Das am meisten verwendete Modell ist die db/db-Maus. Bei diesem, erstmals 1966 in den Laboratorien von Jackson entwickelten Modell [106] ist eine Fehlregulation der Leptinsignaltransduktion die Ursache für den Diabetes. Das autosomal-rezessiv vererbte db-Gen stellt eine Punktmutation im Gen für den Leptinrezeptor dar. Dadurch wird das Gen fehlerhaft gespleißt, wodurch die Signaltransduktion von Leptin im Hypothalamus gestört wird. Die Mäuse verspüren kein Sättigungsgefühl und entwickeln aufgrund der Hyperphagie ein zunehmendes Übergewicht mit hohen Leptinspiegeln und Hyperinsulinämie [199]. Erstmals eingebracht wurde das db-Gen in einen Stamm, der 84 % der Allele mit dem C57BL/6-Stamm und 16 % der Allele mit dem DBA/2J-Stamm gemeinsam hat. Zu Ehren des Entwicklers, Dr. N. Kaliss, nannte man diesen Stamm fortan C57BLKS/J^{Lepr} (*C57 black Kaliss Hintergrund*). Ab dem 10. Lebenstag entwickeln diese Mäuse eine Hyperinsulinämie und nach etwa 4 Wochen lässt sich die Hyperglykämie feststellen. Ab dem 5.-6. Monat beginnen die Inselzellen schließlich zunehmend zu degenerieren. Etwa ab dem 6. Lebensmonat sind Zeichen einer diabetischen Nierenschädigung erkennbar. Die Tiere zeigen eine zunehmende Tubulusdilataion, Tubulusatrophie, interstitielle Fibrose und Leukozyteninfiltrate im Tubulointerstitium [27]. Ähnlichkeiten mit der Erkrankung beim Menschen bestehen in der renalen Hypertrophie, der Vergrößerung der Glomeruli, der Expansion der mesangialen Matrix und der Entwicklung einer Albuminurie [199].

2.1.2.3 Diabetische Nephropathie

2.1.2.3.1 Epidemiologie

In den letzten Jahrzehnten konnte man einen dramatischen Anstieg der Inzidenz und Prävalenz des Diabetes mellitus beobachten. Dabei handelt es sich in erster Linie um eine Zunahme des Typ 2 Diabetes im Rahmen des sogenannten Metabolischen Syndroms. Dieses Syndrom, bestehend aus Übergewicht, Dyslipidämie, Hypertonie und Hyperglykämie, lässt sich ursächlich zurückführen auf die veränderten Lebensumstände und –gewohnheiten der letzten Jahrzehnte, vor allem dem Überangebot an Nahrungsmitteln bei zunehmendem Mangel an Bewegung durch überwiegend sitzende berufliche Tätigkeit [238].

Schätzungen zufolge leiden in Deutschland etwa 6 % der Gesamtbevölkerung und etwa 20 % der über 80-jährigen an Typ-2-Diabetes [180]. Weltweit gab es im Jahr 2000 etwa 150 Millionen Diabetiker, für das Jahr 2010 geht man bereits von etwa 220 Millionen [6] und für das Jahr 2025 von 300 Millionen aus [124]. Sowohl Industrienationen als auch Schwellen- und Entwicklungsländer sind gleichermaßen von dieser Entwicklung betroffen. Der Diabetes mellitus kann daher als weltweite Epidemie angesehen werden [237].

In welchem Ausmaß sich diese Entwicklung auf die Gesundheitssysteme der Zukunft auswirken wird, lässt sich bereits erahnen, wenn man bedenkt, dass die diabetische Nephropathie, die etwa 25-30 % der Diabetiker im Laufe ihrer Erkrankung entwickeln werden [2, 101], bereits heute die häufigste Ursache des terminalen Nierenversagens und damit der Dialysepflichtigkeit darstellt (Abbildung 1) [66].

2.1.2.3.2 Pathologie

Kimmelstiel und Wilson beschrieben zu Beginn des 20. Jahrhunderts erstmals die pathomorphologischen Veränderungen in der Niere von Diabetikern [123]. Nach etwa 10-15 Jahren entwickeln 25-30 % der Diabetiker eine diabetische Nephropathie [2, 101] mit typischen, individuell unterschiedlich stark ausgeprägten glomerulären, tubulointerstitiellen und vaskulären Schäden.

Durch die bereits in der Frühphase der Erkrankung einsetzende glomeruläre Hyperfiltration und Hyperperfusion kommt es zur Hypertrophie und damit zur Größenzunahme der Glomeruli [152]. Glykosylierung und Einlagerung von *advanced glycation end products* (AGE) führen zu einer Verdickung der glomerulären Basalmembran. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer zunehmenden Expansion des Mesangiums mit teils diffuser, teils knotiger Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Das Vollbild der glomerulären Schädigung imponiert bei Typ-2-Diabetikern häufiger als diffuse Glomerulosklerose (Abbildung 2-A), während Typ-1-Diabetiker häufiger die klassische, von Kimmelstiel und Wilson beschriebene noduläre Glomerulosklerose

(Abbildung 2-B) zeigen [123]. Die glomerulären Arteriolen zeigen zudem typischerweise eine Intimaverdickung und Hyalinose im Sinne einer Mikroangiopathie [167].

Im Tubulointerstitium zeigt sich im fortgeschrittenen Stadium eine charakteristische Trias aus Tubulusatrophie, interstitieller Fibrose und entzündlichem Infiltrat (Abbildung 2). Neben Lymphozyten und Plasmazellen konnte im Tiermodell sowie in menschlichen Nierenbiopsien die Anhäufung von Makrophagen nachgewiesen werden [69, 190]. Makrophagen spielen in verschiedenen Tiermodellen der immunvermittelten Nierenschädigung eine entscheidende Rolle, zudem korreliert ihre Anzahl mit dem Ausmaß der Nierenschädigung bei der humanen Glomerulonephritis [161]. Chow et al. konnten im Tiermodell nachweisen, dass die Anzahl rekrutierter Makrophagen in der Niere mit einer Progression der diabetischen Nephropathie korreliert [27], so dass eine pathogenetische Rolle der Makrophagen auch für die diabetische Nephropathie angenommen werden kann.

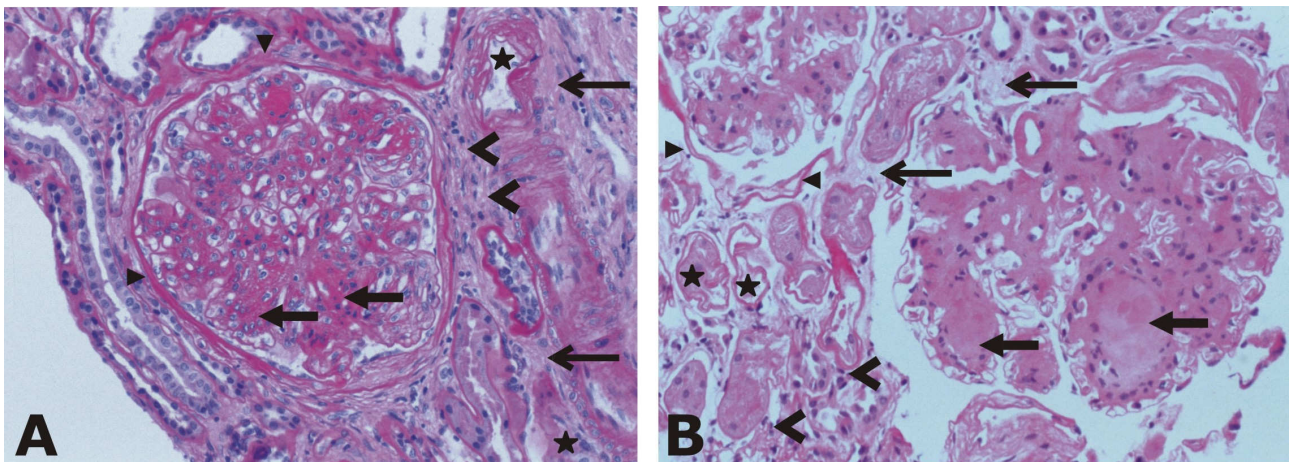


Abbildung 2: Typisches histologisches Schädigungsmuster bei diabetischer Nephropathie [63]. Diffuse (A) bzw. noduläre (B) Glomerulosklerose mit Erweiterung des Mesangiums (←), Verdickung der glomerulären Basalmembran (▼), Tubulusatrophie (★), tubulointerstitieller Fibrose (←) und entzündlichem Infiltrat (◄). Vergrößerung 200 x, PAS-Färbung.

Der klinische Verlauf der diabetischen Nephropathie folgt nach Mogensen verschiedenen Phasen [153]. Anfangs verläuft die diabetische Nephropathie trotz ultrastruktureller Veränderungen lange Zeit asymptomatisch, die GFR als Marker der Nierenfunktion ist im Normbereich bzw. als Zeichen einer Hyperfiltration meist sogar erhöht. Die GFR bleibt darüber hinaus lange Zeit normwertig, obwohl mittels spezieller Teststreifen eine Mikroalbuminurie (Ausscheidung von bis zu 200 mg Albumin pro Liter Urin) als klinisches Zeichen einer Nierenschädigung messbar ist. Durch die chronische Nierenschädigung steigt die Eiweißausscheidung über dieses Maß hinaus, die Mikroalbuminurie entwickelt sich zu einer Makroalbuminurie. Erst in dieser späten Erkrankungsphase ist ein Abfall der GFR feststellbar. Die Diagnose der chronischen Niereninsuffizienz aufgrund diabetischer Nephropathie wird

daher meist verspätet gestellt, so dass nur ein kleines therapeutisches Fenster von wenigen Jahren bleibt, ehe die terminale Niereninsuffizienz und damit Dialysepflichtigkeit bevorsteht (Abbildung 3).

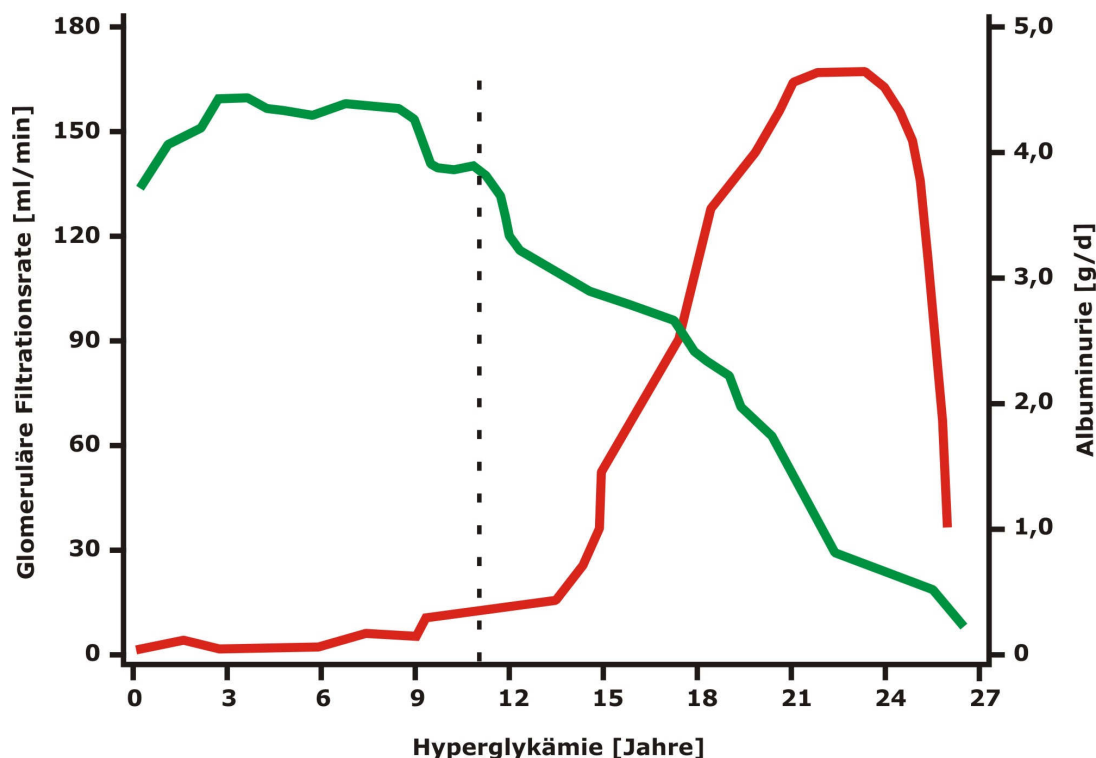


Abbildung 3: Progression der diabetischen Nephropathie. Zu Beginn einer Diabeteserkrankung steigt die GFR an (Hyperfiltration). Erst nach Jahren beginnt die langsame kontinuierliche Abnahme (■). Insgesamt bleibt die GFR über Jahre im Normbereich, obwohl bereits eine Nierenschädigung vorliegt (---), die anhand der Albuminurie klinisch diagnostizierbar ist (■). Ist die GFR eingeschränkt, liegt bereits eine fortgeschrittene Nephropathie vor, die bereits wenige Jahre später zum terminalen Nierenversagen führt [67].

2.1.2.3.3 Pathogenese

Unabhängig vom Diabetestyp liegen den histologischen Schädigungsmustern identische pathophysiologische Mechanismen zugrunde [153]. Hämodynamische, metabolische und hormonelle Veränderungen münden in eine gemeinsame Endstrecke chronischer Nierenerkrankungen, der Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, die ihrerseits zu Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose und Tubulusatrophie führen (Abbildung 4).

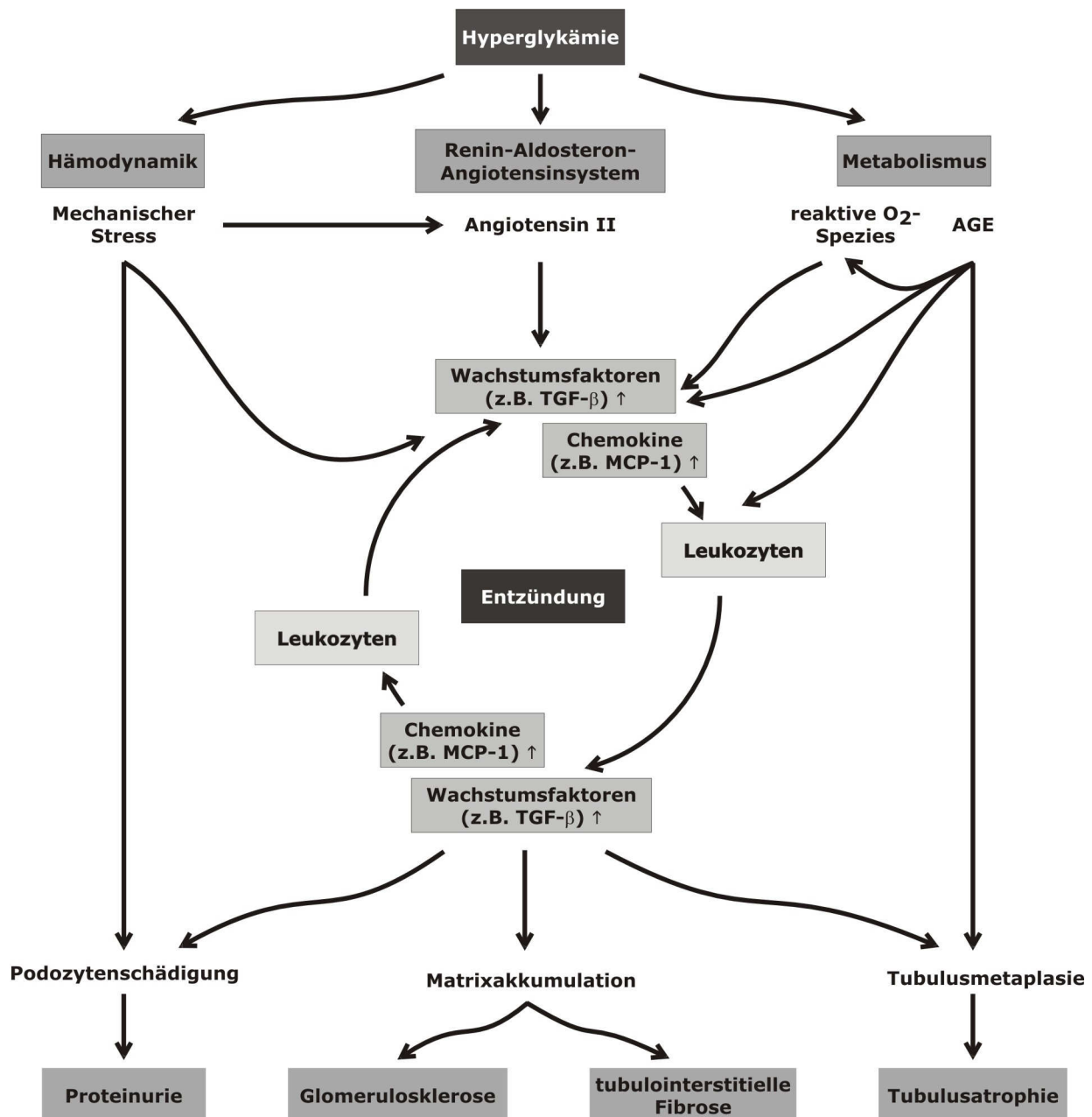


Abbildung 4: Pathogenese der diabetischen Nephropathie (nach [35]). Hämodynamische, metabolische und hormonelle Mechanismen führen zu Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose, Tubulusatrophie und Verlust der Nierenfunktion. Durch Freisetzung von Chemokinen kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten in die Niere, die ihrerseits Chemokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, wodurch eine chronisch-entzündliche Reaktion aufrecht erhalten wird.

Die physiologische Autoregulation der Nierendurchblutung ist bei der Entstehung der diabetischen Nephropathie bereits früh gestört, es kommt zu intraglomerulärer Drucksteigerung, Hyperperfusion und mechanischer Belastung glomerulärer Kapillaren [25]. Dieser mechanische Stress führt dazu, dass Mesangialzellen profibrotische Zytokine, Chemokine und Angiotensin II synthetisieren und damit bereits in der Frühphase die Podozyten schädigen [36], die vermehrt apoptotisch werden. Da die verbleibenden Podozyten eine veränderte Genexpression zeigen, wird die glomeruläre Filtrationsbarriere sowohl

morphologisch als auch funktionell zunehmend geschädigt, es resultiert zunächst eine Mikroalbuminurie und später eine Makroalbuminurie [67].

Eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie spielt das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [187], das einerseits metabolische und hämodynamische Mechanismen miteinander verknüpft, andererseits durch Induktion von profibrotischen und proinflammatorischen Mediatoren auch zur direkten Schädigung der Niere beiträgt. Hyperglykämie und Proteinurie stimulieren in der Niere die Synthese von Angiotensin II. Bei diabetischer Stoffwechsellage werden außerdem alternative Synthesewege, etwa über das Angiotensin-Converting-Enzyme 2 (ACE 2) oder die Chymase verstärkt [45, 103]. Die Wirkungen des Angiotensin II auf die Niere sind vielfältig. Angiotensin II führt durch Änderung der Gefäßwiderstände zu gestörter glomerulärer Hämodynamik, zu einer zunehmenden Apoptose von Podozyten und durch Induktion der TGF- β - und VEGF-Expression zu einer gesteigerten Synthese von Kollagen-IV in der glomerulären Basalmembran. Die glomeruläre Filtrationsbarriere wird dadurch gestört, es resultiert eine zunehmende Proteinurie. Daneben werden Matrixproteine wie Fibronectin oder Kollagen gesteigert, matrixabbauende Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen dagegen vermindert exprimiert, was das physiologische Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Abbau stört, so zur Anhäufung extrazellulärer Matrix und damit zur Fibrose führt. Angiotensin II induziert die Synthese von TGF- β und ist so indirekt an der sog. Epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) beteiligt [114], einem Prozess der fortgeschrittenen diabetischen Nephropathie, bei dem Tubulusepithelzellen metaplasieren und Myofibroblasten entstehen. Zunehmende Tubulusatrophie und gesteigerte Matrixsynthese sind die Folgen. Angiotensin II trägt außerdem zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion bei, indem es die Synthese von Adhäsionsmolekülen induziert und damit die Rekrutierung von Immunzellen steigert.

Nicht weniger bedeutend für die Entstehung der diabetischen Nephropathie sind die metabolischen Mechanismen. Durch das Überangebot an Glukose werden alternative Stoffwechselwege aktiviert, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die direkt zytotoxisch wirken, aber auch über die Aktivierung der Proteinkinase C an der Entstehung von Entzündung und Fibrose beteiligt sind. Die Hyperglykämie führt zur nicht-enzymatischen Glykosylierung freier Aminogruppen von Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren. Die anfallenden *advanced glycation end products* (AGE) spielen in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie eine entscheidende Rolle [65], da sie durch die zugrunde liegenden Nierenschädigung akkumulieren. Durch AGE werden Proteine der Basalmembranen quervernetzt, was zu geänderter Oberflächenspannung, reduzierter Thermostabilität oder vermindertem Widerstandsvermögen gegenüber enzymatischem Abbau führt. Daneben werden Zelladhäsion und Zellwachstum gestört, was die Zusammenlagerung der einzelnen Kollagenketten innerhalb der Basalmembranen beeinflusst. AGE führen darüber hinaus zu

verstärkter Expression extrazellulärer Matrixproteine und abgeschwächter Expression von Matrix-Metalloproteinasen und tragen damit zur Fibroseentstehung bei. Nach Bindung von AGE an RAGE, einem Oberflächenrezeptor, der bei diabetischer Nephropathie in der Niere hochreguliert ist und mit der Akkumulation von AGE korreliert [229], kommt es zu zusätzlicher Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, zur gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine, zur Induktion von Angiotensin II und zu verstärkter Transdifferenzierung von Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten [140]. Zudem fungiert RAGE als endothelialer Adhäsionsrezeptor für Leukozyten und trägt somit auch zur Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion bei [26].

2.1.3 Alport-Syndrom

2.1.3.1 Epidemiologie und Genetik

Unter dem Alport-Syndrom versteht man eine erstmals 1927 von Arthur Alport beschriebene hereditäre Nierenerkrankung, die mit progredienter Niereninsuffizienz, Taubheit und typischen Augenveränderungen einhergeht [5]. Es ist die häufigste erbliche Nierenerkrankung bei Kindern und Jugendlichen, allein in Deutschland sind über 1.000 Familien betroffen [203]. Etwa 1 % aller niereninsuffizienten Patienten ist am Alport-Syndrom erkrankt (Abbildung 1) [66].

Der Erkrankung liegt eine Mutation in einem der sechs Kollagen-IV-Gene (COL4A1-COL4A6) zugrunde. Diese Gene sind jeweils paarweise „kopf-an-kopf“ auf den Chromosomen angeordnet, COL4A1 und COL4A2 auf dem Chromosom 13q23, COL4A3 und COL4A4 auf dem Chromosom 2q36-37 sowie COL4A5 und COL4A6 auf Chromosom X22.3 [99, 166, 212]. In 85 % der Fälle liegt der Erkrankung ein Gendefekt im COL4A5-Gen zugrunde, die Vererbung erfolgt X-chromosomal, in 10-15 % liegt ein homozygoter bzw. compound-heterozygoter Gendefekt im COL4A3- bzw. COL4A4-Gen zugrunde, die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv [60]. Selten findet sich die autosomal-dominante Vererbung einer COL4A3- oder COL4A4-Mutation [105]. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer Mutation des COL4A5-Gens und des benachbarten COL4A6-Gens kommt es zusätzlich zu einer Leiomyomatose [105]. Die Prävalenz des X-chromosomalen Alport-Syndroms schätzt man auf 1:5.000 [79], die des autosomalen Alport-Syndroms auf 1:50.000 [84]. Etwa 1 % der Bevölkerung sind heterozygote Genträger, die an der sog. Benignen Familiären Hämaturie (BFH) erkrankt sind und lediglich eine einheitlich ausgedünnte, aber strukturell normale glomeruläre Basalmembran zeigen. Einziges klinisches Zeichen ist eine persistierende oder rezidivierende Hämaturie ohne Progression zur Niereninsuffizienz oder extrarenalen Manifestationen (Tabelle 3) [86, 89].

Für das X-chromosomale Alport-Syndrom konnte eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp nachgewiesen werden [83, 109, 110]. Mutationen wie etwa Missense-Mutationen, die lediglich die Proteinstruktur verändern, führen zu einer milden Verlaufsform der Erkrankung.

Patienten mit dieser Art Mutation leiden seltener an Innenohrschwerhörigkeit und Augenveränderungen und erreichen die terminale Niereninsuffizienz durchschnittlich im Alter von 25 Jahren [83, 109]. Die häufigen Glycinmutationen, die vermutlich ein Abknicken der Tripel-Helixstruktur des Kollagens bewirken, führen zu einer Verlaufsform, die umso milder ist, je weiter die Mutation in Richtung des N-terminalen Endes liegt. Betroffene Patienten erreichen teilweise erst mit über 30 Jahren die terminale Niereninsuffizienz [83]. Mutationen der NC1-Domäne, der „donor split site“ oder Mutationen, die zu einem verkürzten Protein führen wie etwa „large rearrangements“, „premature stop codon-“ oder „frameshift-Mutationen“ führen dagegen zur juvenilen Form des Alport-Syndroms mit einem Durchschnittsalter bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz von unter 20 Jahren.

Für das autosomal-rezessive Alport-Syndrom lassen sich aufgrund der bislang wenigen beschriebenen Mutationen derzeit noch keine Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beschreiben.

Tabelle 3: Genetik des Alport-Syndroms (nach [79, 105]).

	<u>Gen</u>	<u>Genlocus</u>	<u>Mutation</u>	<u>Häufigkeit</u>	<u>Neumutationsrate</u>
XAS	COL4A5	Xq22	Glycinmutationen	40 %	5,5 %
			Frameshift	20 %	10-15 %
			Large	15 %	10-15 %
			Rearrangement	7,5 %	10-15 %
			Nonsense	je 7,5 %	je 10-15 %
			Spleißvarianten	2,5 %	unbekannt
			In frame		
XAS und Leiomomatose	COL4A5 und COL4A6	Xq22	Deletion	< 2 %	unbekannt
ARAS	COL4A3 oder COL4A4	2q35-37	Insertion, Deletion, Frameshift, Nonsense, Missense	unbekannt	unbekannt
ADAS	COL4A3 oder COL4A4	2q35-37	Deletion, Spleißvarianten	unbekannt	unbekannt
BFH	COL4A3 oder COL4A4	2q35-37	Spleißvarianten, Frameshift, Missense	unbekannt	unbekannt

XAS: X-Chromosomales Alport-Syndrom, ARAS: Autosomal-rezessives Alport-Syndrom, ADAS: Autosomal-dominantes Alport-Syndrom, BFH: Benigne Familiäre Hämaturie.

2.1.3.2 Pathologie

Beim Alport-Syndrom zeigt sich lichtmikroskopisch das unspezifische Bild einer segmentalen Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose bei fehlender Immunkomplexablagerung [173].

Typische histopathologische Veränderungen lassen sich beim Alport-Syndrom nur elektronenmikroskopisch nachweisen (Abbildung 5). Die dreischichtige Struktur der glomerulären Basalmembran mit zwei Laminae rarae und zentraler Lamina densa ist beim Alport-Syndrom zerstört. Die normal etwa 300-350 nm dicke GBM ist teils auf bis zu 1.200 nm verdickt, teils auf 100 nm ausgedünnt und erscheint aufgesplittert und lamelliert. Die Lamina densa zeigt sich als netzartige bis korbgeflechtartige Struktur [89]. Häufig finden sich elektronendichte Granula in der GBM eingebettet. Etwa 60-90 % der Alport-Patienten zeigen diese histologischen Befunde, die typisch aber nicht spezifisch für das Alport-Syndrom sind. Eine segmentale Aufsplitterung der GBM findet sich beispielsweise auch bei Immunkomplex-Glomerulonephritiden [120], eine diffuse Verdickung auch bei diabetischer Nephropathie [167].

Die verbleibenden Patienten zeigen mehrheitlich eine gleichmäßig ausgedünnte glomeruläre Basalmembran [147], die sowohl den charakteristischen Befund der FBH als auch eine mögliche primäre Veränderung beim Alport-Syndrom darstellt. Aus diesem Grund wird die zweimalige Biopsie im Alter von 9 und 18 Jahren empfohlen, die im Falle des Alport-Syndroms eine Progression von ausgedünnter zu verdickter und aufgesplitteter GBM zeigen kann [24].

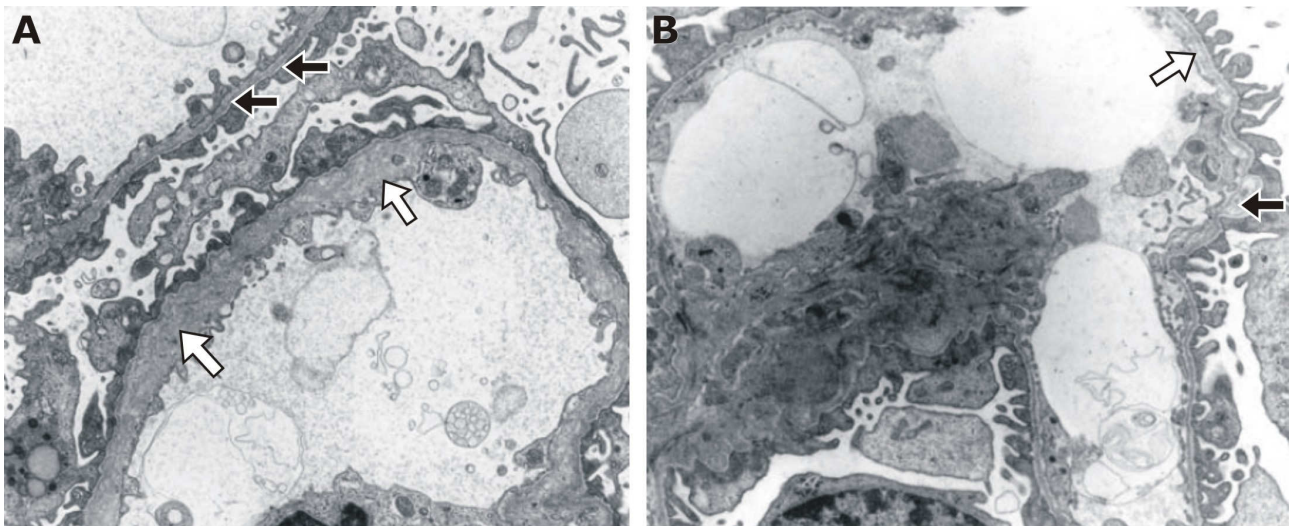


Abbildung 5: Typische elektronenmikroskopische Befunde beim Alport-Syndrom [225]. **A** Die glomeruläre Basalmembran zeigt sowohl verdickte und korbgeflechtartig aufgesplitterte (weiße Pfeile) sowie ausgedünnte Abschnitte (schwarze Pfeile). Vergrößerung x 9.200. **B** Ausgedünnte glomeruläre Basalmembran mit Lamellierung (weißer Pfeil) und elektronendichten Partikeln (schwarzer Pfeil). Vergrößerung 7.400x.

Der Verlauf und die klinische Symptomatik beim Alport-Syndrom sind sehr variabel und werden von Geschlecht, Genotyp und dem Ausmaß der histologischen Schädigung beeinflusst. Beim X-chromosomalen Alport-Syndrom verläuft die Erkrankung bei hemizygoten Männern im Allgemeinen schwerer als bei heterozygoten Frauen, die, je nach Muster der X-Inaktivierung, einen sehr heterogenen Krankheitsverlauf zeigen [174]. Beim autosomalen Alport zeigen sich keine Unterschiede zwischen homozygoten oder compound-heterozygoten Männern und Frauen. Ebenso korrelieren der Genotyp (siehe 2.1.3.1) und die ultrastrukturellen Veränderungen oft mit dem klinischen Schweregrad. So bedeutet beispielsweise eine diffus ausgedünnte GBM meist eine milde Verlaufsform ohne Taubheit [173].

Das Leitsymptom des Alport-Syndroms ist die Hämaturie. Beim X-chromosomalen Alport-Syndrom zeigt sie sich bei allen Männern als persistierende Mikrohämaturie seit der Kindheit und bei 95 % der Frauen als intermittierende Mikrohämaturie [173]. Etwa zwei Drittel aller Männer und ein Drittel aller Frauen erleben makrohämaturische Episoden, typischerweise nach Infektionen der oberen Atemwege [89]. Beim autosomal-rezessiven Alport-Syndrom haben alle homozygoten Patienten eine Mikrohämaturie mit häufigen Episoden der Makrohämaturie.

Im Verlauf der Erkrankung entwickeln alle männlichen und zwei Drittel der weiblichen XAS- sowie alle homozygoten ARAS-Patienten zusätzlich eine Proteinurie, die sich in 30 % der Fälle zu einem nephrotischen Syndrom entwickelt [87, 120].

Die Nierenschädigung beim Alport-Syndrom ist progredient und führt zur terminalen Niereninsuffizienz. Alle Männer mit X-chromosomalem Alport-Syndrom entwickeln ein terminales Nierenversagen, 50 % bereits bis zum 25. Lebensjahr, 80 % bis zum 40. Lebensjahr [119]. Frauen erreichen das Nierenversagen in 12 % bis zum 40., in 30 % bis zum 60. Lebensjahr [89]. Nach dem Alter bei Erreichen der terminalen Niereninsuffizienz, vor oder nach dem 31. Lebensjahr, unterscheidet man eine juvenile und eine adulte Verlaufsform [76]. Risikofaktoren für die Progression sind das Auftreten einer Makrohämaturie in der Kindheit, eines nephrotischen Syndroms und die diffuse GBM-Verdickung [88].

Eine Innenohrschädigung entwickeln 80 % der männlichen und 30 % der weiblichen XAS-Patienten vor dem 40. Lebensjahr sowie 66 % der ARAS-Patienten vor dem 20. Lebensjahr [109, 110]. Sie zeigt sich anfangs als bilaterale Hochtonschwerhörigkeit, die sich im Verlauf der Erkrankung auch auf tiefe Frequenzen ausdehnt [120].

Etwa die Hälfte aller Alport-Patienten zeigt Augenschäden [109, 110]. Der anteriore Lentikonus tritt bei 25 % der Männer auf und ist pathognomonisch für das Alport-Syndrom [212]. Ebenso ist es ein verlässlicher Marker für die Schwere der Erkrankung, da es mit schneller Progression zum terminalen Nierenversagen assoziiert ist [87, 88, 120]. Daneben finden sich korneale Erosionen und eine Retinopathie, die 85 % der Männer und 15 % der Frauen entwickeln und die sich als asymptomatische bilaterale weiß-gelbliche punktförmige Läsionen um die Makula zeigt [89, 212].

2.1.3.3 Pathogenese

Das Alport-Syndrom ist eine angeborene Basalmembranerkrankung. Basalmembranen bestehen aus spezifisch zusammengelagertem Kollagen Typ IV und assoziierten Proteinen wie Laminin, Nidogen und Proteoglykanen [232].

Beim Menschen besteht das Kollagen Typ IV aus insgesamt sechs verschiedenen α -Ketten (α_1 - α_6), die von sechs Genen (COL4A1-6) kodiert werden [100, 136, 146, 158, 204, 236]. Jede der sechs α -Ketten besteht aus 3 Domänen, einer kurzen 7S-Domäne am N-Terminus, einer langen kollagenösen Domäne im Zentrum des Moleküls und einer nichtkollagenösen (NC1-) Domäne am C-Terminus. Jeweils 3 α -Ketten lagern sich zu einem tripelhelikalen Kollagenmolekül, dem sog. Protomer zusammen. Protomere polymerisieren ihrerseits zu Netzwerken, indem jeweils zwei NC1-Trimere Hexamere und jeweils vier tripelhelikale 7S-Domänen Tetramere formen, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Abbildung 6).

Die drei beim Menschen vorkommenden Protomere ($\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$, $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ und $\alpha_5.\alpha_5.\alpha_6$) bilden insgesamt drei verschiedene Netzwerke, $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ - $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$, $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ - $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ und $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ - $\alpha_5.\alpha_5.\alpha_6$, die sich unterschiedlich auf einzelne Organe und Entwicklungsstufen verteilen [104]. Das $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ -Netzwerk findet sich ubiquitär [105], während $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Netzwerke an Filtrationsbarrieren (glomeruläre und teilweise tubuläre Basalmembran, Lunge, Hoden, Cochlea, Auge) [41, 113, 115] und $\alpha_5.\alpha_5.\alpha_6$ -Netzwerke an Stellen verstärkter Dehnungsbelastung (Bowman-Kapsel, Haut, glatte Muskulatur, Ösophagus) [20, 164] vorkommen. In der Niere erfolgt darüber hinaus ein sog. „*developmental switch*“. In der sich entwickelnden Niere finden sich anfangs ausschließlich $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ -Netzwerke, die in glomerulären Kapillaren zunehmend durch $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ [92, 115, 151] und in der Bowman-Kapsel durch $\alpha_5.\alpha_5.\alpha_6$ [20, 92, 172] ersetzt werden.

Das Alport-Syndrom wird durch einen Gendefekt im COL4A3- oder COL4A4- (autosomales Alport-Syndrom) bzw. COL4A5-Gen (X-chromosomales Alport-Syndrom) verursacht. Dies führt dazu, dass die entsprechende α -Kette fehlerhaft oder gar nicht synthetisiert wird und die Zusammenlagerung zu den entsprechenden Protomeren bzw. Netzwerken scheitert. Unabhängig davon, welche α -Kette (α_3 , α_4 oder α_5) betroffen ist, resultiert der Gendefekt in einem Verlust der $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Protomere und $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ - $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Netzwerke. Bei Alport-Patienten besteht die glomeruläre Basalmembran daher aus dem embryonalen $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ -Netzwerk, da der „*developmental switch*“ ausbleibt. Weibliche XAS-Patienten zeigen ein segmentales Verteilungsmuster der $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Netzwerke entsprechend dem Muster der X-Inaktivierung [117]. Trotz fehlenden $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Netzwerkes ist die glomeruläre Basalmembran anfangs morphologisch und funktionell intakt, da das für die Glomerulogenese wichtige $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ -Netzwerk vorhanden ist [92]. Das $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ -Netzwerk ist dagegen aufgrund der

höheren Anzahl an Disulfidbrücken und der damit verbundenen höheren Stabilität für die langfristige Integrität der GBM von Bedeutung [115].

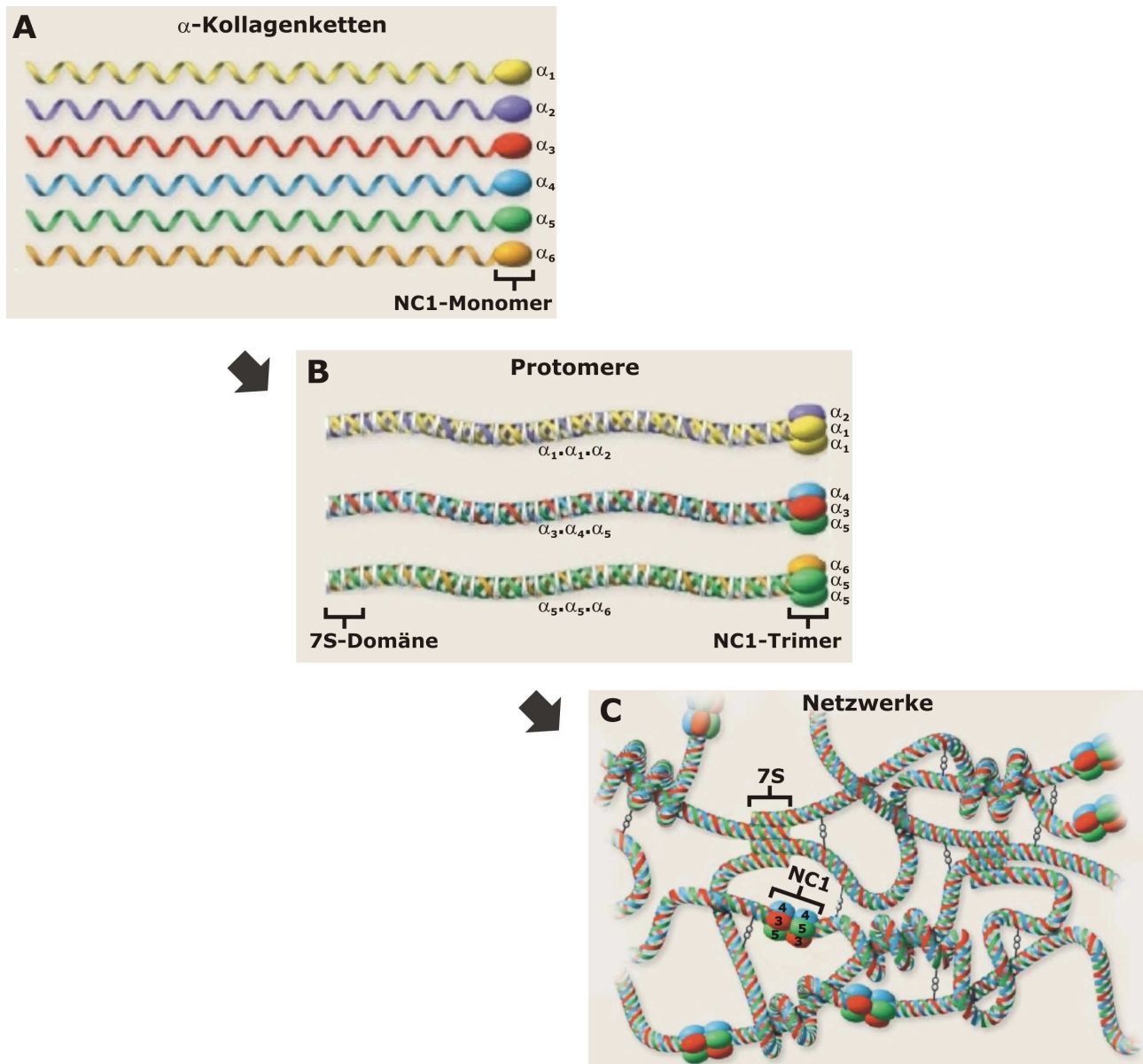


Abbildung 6: Typ-IV-Kollagen. **A/B** Jeweils drei der insgesamt sechs α -Ketten (α_1 - α_6) lagern sich zu drei verschiedenen Protomeren zusammen. **C** Protomere lagern sich am C-Terminus zu Hexameren, am N-Terminus zu tripelhelikalen 7S-Tetrameren zusammen und formen so dreidimensionale Netzwerke aus Schleifen und Knäuel, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Dargestellt ist ein α_3 . α_4 . α_5 -Netzwerk wie es beispielsweise in der glomerulären Basalmembran vorkommt. (nach [105]).

Aufgrund der veränderten glomerulären Basalmembran ist die Zell-Matrix-Interaktion beim Alport-Syndrom gestört [40, 80]. Ortsständige Zellen erkennen die Basalmembran über Kollagenrezeptoren wie den *Discoidin-Domain-Receptor-1* (DDR1) und exprimieren daraufhin profibrotische Faktoren wie TGF- β und CTGF, Matrix-Metalloproteinasen wie MMP2 und MMP9 sowie Chemokine [85]. Daneben werden auch Oberflächenmoleküle wie die Integrine $\alpha_1\beta_1$

oder $\alpha\text{v}\beta 6$ hochreguliert, die Matrixremodelling, Zelladhäsion, Migration und Proliferation teils über die Hochregulation von Matrix-Metalloproteinasen vermitteln [38, 40, 90]. Aufgrund des zugrunde liegenden genetischen Defekts schlagen diese Reparaturmechanismen jedoch fehl und führen stattdessen zu einer chronisch-progredienten Nierenschädigung.

Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind eine Familie von Endopeptidasen, die am physiologischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind [177, 178]. Eine Dysregulation der MMP könnte somit sowohl die verdünnte wie auch die verdickte Basalmembran als Folge einer gesteigerten bzw. verminderten Matrixdegradation erklären [1, 39, 40]. Beim Alport-Syndrom ist die Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP2, MMP3, MMP9 und MMP12 stark erhöht und korreliert mit der Progression der Glomerulopathie [179]. Durch Interventionsstudien konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockade der MMP die Ultrastruktur der glomerulären Basalmembran bewahren, die Proteinurie hinauszögern, die Progression der Nierenschädigung verlangsamen und damit das Überleben verlängern kann [179, 233]. Diese protektiven Effekte lassen sich jedoch nur beobachten, wenn die Blockade vor Auftreten einer Proteinurie beginnt. Eine späte Blockade beschleunigt dagegen die Progression, weil nach einer Hypothese von Zeisberg die im Rahmen der Fibroseentstehung anfallende Matrix nicht mehr abgebaut werden kann [233].

Eine große Bedeutung hat daneben das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das in der Pathogenese des Alport-Syndroms ähnliche profibrotische und proinflammatorische Effekte vermittelt wie bei der diabetischen Nephropathie [187]. Mesangialzellen und interstitielle Fibroblasten werden zur Synthese von extrazellulärer Matrix stimuliert, die physiologische Matrixdegradation wird blockiert, die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird induziert und profibrotische Mediatoren wie TGF- β und CTGF werden hochreguliert [81, 150, 186, 192], Mechanismen, die zu Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose führen. Durch Aktivierung mononukleärer Zellen und Induktion der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie etwa MCP-1 ist Angiotensin II auch an der Rekrutierung von Makrophagen und der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beteiligt (Abbildung 7) [183-185].

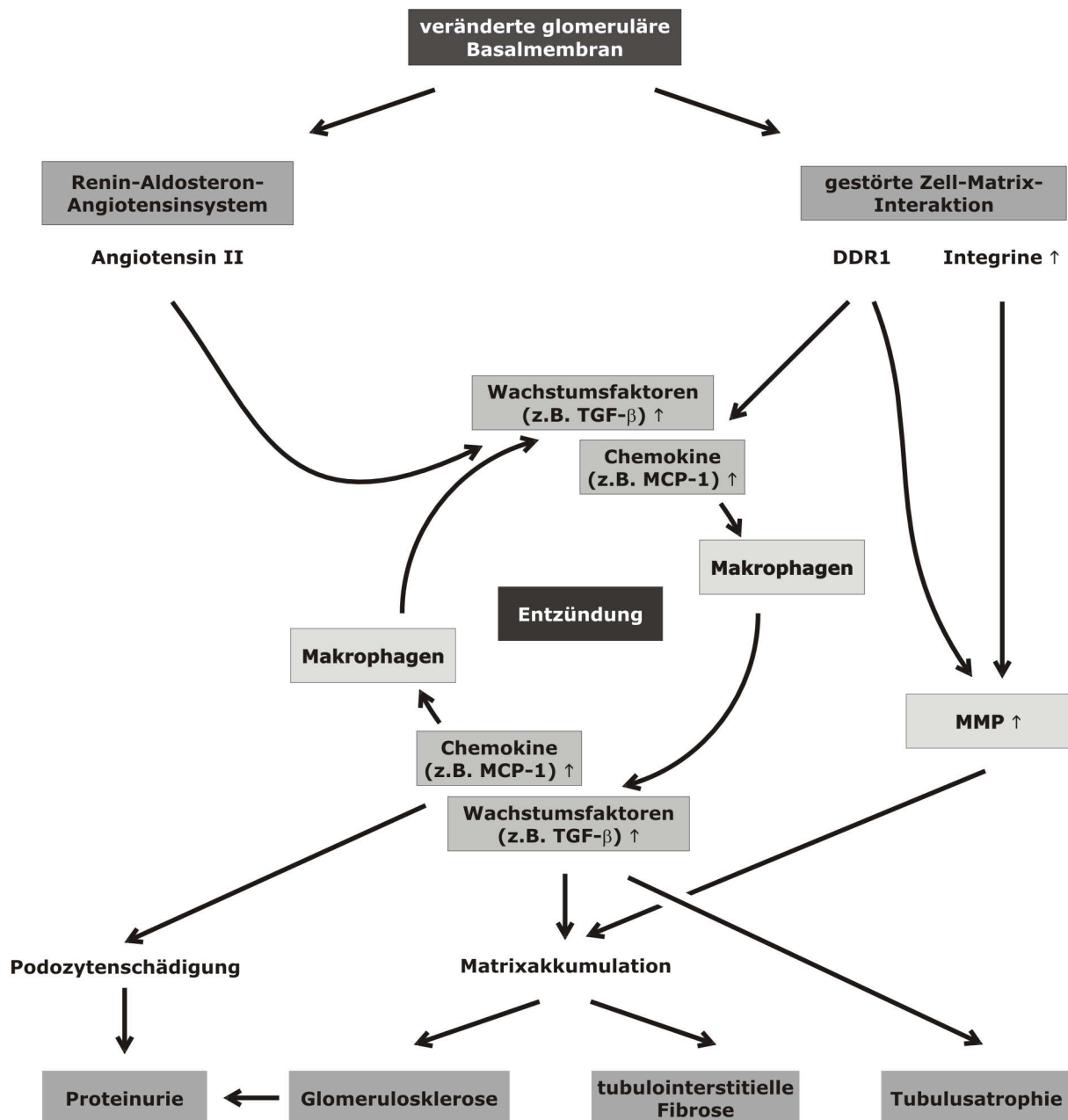


Abbildung 7: Pathogenese des Alport-Syndroms. Durch die veränderte glomeruläre Basalmembran wird die Zell-Matrix-Interaktion gestört, es kommt zur Hochregulation von Matrix-Metalloproteinasen und zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems. Durch Freisetzung von Chemokinen kommt es zur Rekrutierung von Makrophagen in die Niere, die ihrerseits Chemokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, wodurch eine chronisch-entzündliche Reaktion aufrecht erhalten wird. Diese Mechanismen führen schließlich zu Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose, Tubulusatrophie und Verlust der Nierenfunktion.

2.1.3.4 Therapie

Derzeit gibt es keine kausale Therapie des Alport-Syndroms, so dass die Nierenersatztherapie bzw. die Nierentransplantation die einzige Behandlung darstellen. Das Transplantatüberleben ist mit durchschnittlich 25 Jahren bei Alportpatienten sehr gut. Bei der Familienspende ist jedoch das mögliche Risiko des verwandten Spenders zu beachten, ebenfalls über einen Gendefekt im Kollagen-4-Gen zu verfügen. Daneben muss mit der typischen Komplikation

einer anti-GBM-Nephritis *post transplantationem* gerechnet werden, die in 3-5 % der Fälle auftritt [119].

Derzeit wird am Menschen die Gabe des ACE-Hemmers Ramipril erprobt, die im Tiermodell das Überleben bei frühzeitiger Gabe um mehr als 100 % verlängern, Proteinurie sowie glomeruläre und tubulointerstitielle Fibrose signifikant reduzieren konnte [81]. ACE-Hemmer zeigen dabei ein höheres nephroprotektives Potential als der AT1-Rezeptorblocker [85]. Auch die Gabe des im Tiermodell positiv evaluierten HMG-CoA-Reductase-Inhibitors Cerivastatin wird derzeit am Menschen erprobt [129].

Darüber hinaus werden derzeit im Tiermodell weitere experimentelle Therapieoptionen untersucht. Der Vasozeptidaseinhibitor AVE7688 zeigte zusätzlich zum antifibrotischen Effekt des ACE-Hemmers auch antiinflammatorische Wirkung, was sich in einem deutlichen Überlebensvorteil selbst bei spätem Therapiebeginn wieder spiegelt [82]. Die Hemmung des Chemokinrezeptors Ccr1 mit dem Antagonisten BX471 verlängerte das Überleben und verzögerte das Fortschreiten der tubulointerstitiellen Fibrose durch Hemmung der Leukozytenadhäsion [162]. Die Blockade des Kollagen-Rezeptors DDR1 verlangsamt den Verlauf der Nierenfibrose [80]. Durch Gabe eines TGF- β -Antagonisten konnten die Morphologie der glomerulären Basalmembran und die Nierenfunktion verbessert werden [40].

Sugimoto et al. konnten zeigen, dass die Transplantation von Knochenmark bei den Kollagen-defizienten Empfängermausen zur Einwanderung von Progenitorzellen in die geschädigte Niere führt. Die Mäuse beginnen, die fehlenden α -Ketten des Kollagens wieder zu exprimieren, die physiologischen Kollagennetzwerke lagern sich zusammen und führen zur Verbesserung der Histologie und der Nierenfunktion [61, 206]. Ein weiterer möglicher Therapieansatz besteht in der Gentherapie, für die jedoch bisher kaum Daten vorliegen [213].

2.1.3.5 Alport-Tiermodelle

Für das Alport-Syndrom wurden bisher verschiedene Hunde- und Mausmodelle beschrieben, die der menschlichen Erkrankung hinsichtlich Hämaturie, Proteinurie, Nierenversagen und lamellierter GBM ähnlich sind [94, 118].

Für das X-chromosomale Alport-Syndrom existieren lediglich zwei Hundemodelle. Im Samojede-Modell [235] wird durch Substitution im Exon 35, im Navasota-Modell [118] durch Deletion und Frameshift in Exon 9 des COL4A5-Gens ein vorzeitiger Kettenabbruch und damit ein defektes Kollagen erzeugt. Beide Modelle zeichnen sich durch ultrastrukturelle Veränderungen aus, die mit denen des Menschen vergleichbar sind. Proteinurie und Hämaturie beginnen etwa ab dem 4. Lebensmonat, das terminale Nierenversagen wird mit 8-10 bzw. 10-15 Monaten erreicht. Augenveränderungen und Taubheit fehlen in beiden Modellen.

Modelle des autosomal-dominanten Alport-Syndroms sind das natürlich vorkommende Bullterrier-Modell [97] und das Dalmatiner-Modell [96], die bisher nur unzureichend charakterisiert wurden. So sind derzeit weder die genaue Mutation noch der genaue Krankheitsverlauf bekannt.

Für das autosomal-rezessive Alport-Syndrom gibt es neben einem Cocker Spaniel Modell auch drei Mausmodelle. Dem tg/tg-Modell liegen Deletionen in den COL4A3- und COL4A4-Genen zugrunde [142], woraufhin die Tiere bereits mit 2 Wochen Hämaturie und Proteinurie entwickeln, bevor sie mit etwa 8-12 Wochen am terminalen Nierenversagen sterben. Daneben gibt es zwei COL4A3-Knockout-Modelle, darunter ein von Dominic Cosgrove entwickeltes Modell [39], bei dem eine Neomycin-Phosphotransferase-Cassette so in Exon 5 des COL4A3-Gens eingebracht wurde, dass die NC1-Domäne durchbrochen wird. Embryonale Stammzellen aus 129Sv/J-Mäusen wurden mit diesem veränderten Gen transfiziert und anschließend in Embryonen eingebracht, die in scheinchwangere Leihmütter transferiert wurden. Neben der $\alpha 3$ -Kette fehlen den Nachkommen auch die $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ -Ketten des Kollagen-IV, da sich der Gendefekt auf der Ebene der Kettenzusammenlagerung manifestiert. Elektronenmikroskopisch erscheint die glomeruläre Basalmembran, ähnlich wie bei der menschlichen Erkrankung, teilweise ausgedünnt, lamelliert und aufgesplittert. Es zeigen sich eine Schwellung und teilweise Obliteration der Podozytenfußfortsätze sowie die Expansion und Fibrosierung der mesangialen Matrix. Bereits im Alter von zwei Wochen zeigt sich eine Mikrohämaturie, im Alter von fünf Wochen eine Proteinurie. Durchschnittlich sterben die Tiere mit 9-10 Wochen am terminalen Nierenversagen [37].

Alle derzeit verfügbaren Tiermodelle haben Vor- und Nachteile [118]. Nachteile der Hundemodelle sind die hohen Anschaffungs- und Unterhaltskosten sowie die lange Generationszeit. Bei den Mausmodellen ist die Übertragbarkeit auf den Menschen fraglich, weil der Mausstamm einen erheblichen Einfluss auf die Erkrankung hat [37] und aufgrund der insgesamt kurzen Lebenserwartung bereits eine geringe Lebenszeitverlängerung signifikant sein kann. Vorteile der Mausmodelle sind dagegen die kurze Generationszeit sowie die schnelle Entwicklung der Erkrankung innerhalb von Monaten.

2.1.4 Molekulare Mechanismen der Progression chronischer Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen führen über verschiedene Mechanismen in eine gemeinsame pathomorphologische Endstrecke aus Glomerulosklerose, Vaskulopathie und tubulointerstitieller Fibrose [64]. Zunehmend finden sich Hinweise, dass auch eine entzündliche Komponente an der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen wie der diabetischen Nephropathie oder der Alport-Nephropathie beteiligt ist [70, 149, 154, 215]. Im Tiermodell konnten beispielsweise durch immunsuppressive Behandlung mit Mycophenolat Mofetil oder durch Bestrahlung die Albuminausscheidung im Urin sowie die Glomerulosklerose reduziert

werden [217, 231]. Zudem scheiden Patienten mit diabetischer Nephropathie große Mengen des Chemokins MCP-1 im Urin aus, möglicherweise ein spezifisches Zeichen einer intrarenalen Entzündung [155, 207, 210]. Der Verlust der Nierenfunktion und damit die Progression zum terminalen Nierenversagen korreliert, unabhängig von der primären Schädigung am stärksten mit dem Ausmaß der tubulointerstitiellen Schädigung und des Leukozyteninfiltrats, da die eingewanderten Leukozyten die Hauptquelle proinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren darstellen [43, 230].

Diese Mediatoren, hauptsächlich Wachstumsfaktoren und Chemokine, spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen, für die sich vier Phasen abgrenzen lassen (Abbildung 8) [10]. Bei einer Nierenschädigung werden initial proinflammatorische Chemokine freigesetzt, die die Einwanderung von Leukozyten in das jeweils geschädigte Kompartiment sowie deren Aktivierung am Ort der Schädigung vermitteln. In der darauffolgenden Phase der Amplifikation sezernieren die eingewanderten Leukozyten ihrerseits Chemokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies. Dadurch werden Nierenzellen direkt geschädigt und der Entzündungsprozess verstärkt, d.h. es werden zusätzlich Chemokine sezerniert, was zu einer weiteren Rekrutierung von Leukozyten mit zunehmender Schädigung führt. Eingewanderte Makrophagen schädigen die Niere darüber hinaus durch Sekretion extrazellulärer Matrix und Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *connective tissue growth factor* (CTGF) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [62]. Eine Schlüsselrolle kommt dem profibrotischen Zytokin TGF- β zu, das sowohl im Tiermodell als auch in humanen Nierenbiopsien in allen Kompartimenten verstärkt exprimiert ist [239]. Verschiedene Stimuli, bei der diabetischen Nephropathie beispielsweise Hyperglykämie, AGE, oxidativer Stress oder Angiotensin II, induzieren die Expression von TGF- β in Tubuluszellen und Mesangialzellen, die darauf hin verstärkt extrazelluläre Matrix synthetisieren. Daneben werden Matrixmetalloproteinasen gehemmt, die Proliferation von Fibroblasten stimuliert und die Umwandlung von Tubuluszellen zu Fibroblasten bewirkt, was zu Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose führt. Funktionelles Nierengewebe geht zunehmend zugrunde und wird durch funktionsloses Bindegewebe ersetzt, bis die Niere im Terminalstadium schließlich vollständig vernarbt und ihre Funktion einstellt.

Eines der beteiligten Chemokine ist das MCP-1, das nach entsprechender Stimulation von allen glomerulären (Endothel, Podozyten, Mesangialzellen) und tubulointerstitiellen Zellarten (Tubulusepithel, Fibroblasten, Endothel) synthetisiert werden kann [198]. CCR2, der Rezeptor für MCP-1, wird von Lymphozyten und Makrophagen exprimiert, was MCP-1 zur Rekrutierung dieser Leukozyten prädestiniert. Bei der diabetischen Nephropathie wird die verstärkte Expression von MCP-1 durch die Hyperglykämie selbst, AGE, Angiotensin II, mechanischen Stress und TGF- β induziert. Auf Podozyten und Tubuluszellen scheint zudem die Proteinurie einen Einfluss zu haben. Das Ausmaß der MCP-1-Ausscheidung korreliert mit der Anzahl an Makrophagen und dem Erkrankungsstadium [210, 221]. Während die genaue Rolle der

Lymphozyten in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie unklar ist, konnte gezeigt werden, dass Makrophagen die zentralen Vermittler der Entzündungsreaktion sind [188] und sich typischerweise in der diabetischen Niere anhäufen [69, 221]. Eingewanderte Makrophagen sezernieren lysosomale Enzyme, reaktive Sauerstoffspezies und profibrotische Wachstumsfaktoren wie TGF- β , wodurch die Niere geschädigt wird [35, 228]. Darüber hinaus induzieren Makrophagen Proteinurie und Proliferation des Mesangiums [107]. Neben dem Fractalkine, das bei diabetischer Nephropathie entlang glomerulärer und peritubulärer Kapillaren verstärkt exprimiert wird [122] und das als Adhäsionsmolekül für migrierende Monozyten dient [7], spielt das MCP-1 eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung der Makrophagen. Mcp-1-defiziente diabetische Mäuse zeigen eine Reduktion der Makrophagenzahl, die mit einer geringeren Nierenschädigung einhergeht [28, 29]. Auch die Blockade des Mcp-1-Rezeptors Ccr2 bzw. Ccr2-defiziente Mäuse zeigen eine Reduktion der Makrophageninfiltration und geringere Nierenschädigung [125]. Darüber hinaus führt auch die Blockade von Ccr1, einem weiteren Chemokinrezeptor, zu einer Reduktion der Makrophagenrekrutierung ins Tubulointerstitium, was mit einer Reduktion proliferierender Tubuluszellen, geringerer Tubulusatrophie und interstitieller Fibrose assoziiert ist [163].

Neben der diabetischen Nephropathie konnte bei vielen Modellen entzündlicher Nierenerkrankungen, etwa der Lupusnephritis [131, 132], der akuten interstitiellen Nephritis [75], der nephrotoxischen Serumnephritis [211] oder der anti-GBM-Nephritis [209] ein Einfluss von MCP-1 und CCR2 nachgewiesen werden.

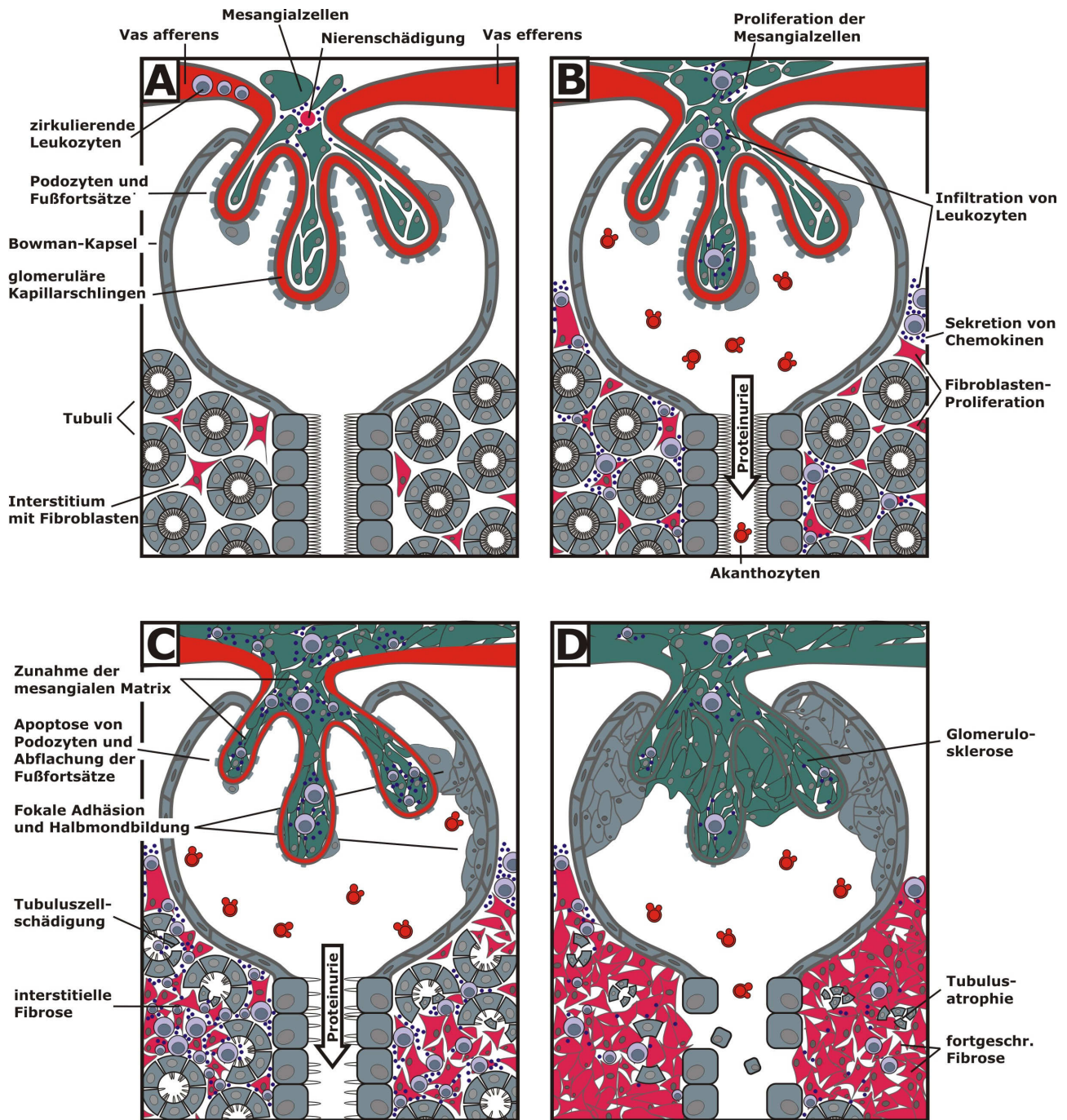


Abbildung 8: Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen (nach [10]). **A** Intrinsische Nierenzellen sezernieren bei einer Nierenschädigung Chemokine, woraufhin Leukozyten rekrutiert werden (Phase der initialen Schädigung). **B** Eingewanderte Leukozyten sezernieren ihrerseits Chemokine, Wachstumsfaktoren und reaktive Sauerstoffspezies. So werden die Entzündungsreaktion aufrecht gehalten und Mesangialzellen bzw. Fibroblasten zur Proliferation stimuliert (Amplifikationsphase). **C** Funktionelles Nierengewebe wird zunehmend durch extrazelluläre Matrix bzw. Bindegewebe ersetzt (Phase der Progression). **D** Vollbild aus Glomerulosklerose, Tubulusatrophie und tubulointerstitieller Fibrose (Terminalphase).

2.1.5 Nephroprotektive Therapie

Die chronische Niereninsuffizienz ist assoziiert mit gesteigerter Morbidität und Mortalität, insbesondere aufgrund des erhöhten kardiovaskulären Risikos [72, 133]. Um die Progression

der chronischen Niereninsuffizienz zu verlangsamen, ist eine spezifische nephroprotektive Therapie erforderlich. Nach den aktuellen Leitlinien der Fachgesellschaften beruht die Therapie auf folgenden Maßnahmen [8]:

- Optimale Blutzuckereinstellung bei Diabetikern mit HbA_{1c}-Zielwerten unter 6,5 % [171]
- Blutdruckkontrolle, da ein Blutdruck von unter 130/80 mmHg die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz verlangsamt [108, 112]
- Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, da dies die glomeruläre Hämodynamik günstig beeinflusst sowie antientzündliche, antiproliferative und antidiabetische Effekte vermittelt [12]
- Vermeidung nephrotoxischer Substanzen wie etwa Röntgenkontrastmittel, Aminoglykoside und Nicht-steroidale Antiphlogistika
- Behandlung einer renalen Anämie mit rekombinantem Erythropoietin, da dies mit einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität assoziiert ist [102]
- Nikotinverzicht [193]
- Kontrolle des Kalzium-Phosphat-Haushalts und Therapie einer im Verlauf auftretenden metabolischen Azidose [8]

Die meisten Zentren empfehlen darüber hinaus eine mäßig proteinreduzierte Diät (0,75 g/kg KG/d), obwohl keine klare Evidenz dafür vorliegt [137]. Aufgrund widersprüchlicher Studienergebnisse fehlt derzeit auch eine klare Empfehlung zum Einsatz von Statinen [8]. Besondere Vorgaben zur täglichen Flüssigkeitsmenge bestehen nicht, sie sollte dem Durstempfinden des Patienten überlassen bleiben [8].

Mit der nephroprotektiven Therapie werden somit gezielt die pathophysiologischen Mechanismen der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz behandelt, ohne jedoch die entzündliche Komponente explizit zu berücksichtigen. Zunehmende Erkenntnisse der molekularen Mechanismen der Progression zeigen neue spezifische therapeutische Optionen, etwa durch gezielte Blockade einzelner Chemokine.

2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

2.2.1 Einteilung

Unter Chemokinen versteht man eine Gruppe niedermolekularer **chemotaktischer Zytokine** [144]. Man gab ihnen diesen Namen, da man anfangs annahm, Chemokine würden lediglich die Migration von Leukozyten vermitteln. Heute weiß man, dass sie darüber hinaus weit mehr bewirken als die bloße Leukozytenzielsteuerung. So sind Chemokine beispielsweise beteiligt an der Regulation des Zellwachstums, der Hämatopoese, der Embryonalentwicklung, der Angiogenese, dem Tumorwachstum oder dem Eintritt des HI-Virus in die Wirtszelle [181].

Bisher wurden 46 Chemokine identifiziert [240]. Man teilt die Chemokine entsprechend der Position von vier konservierten Cysteinresten, die in der Sekundärstruktur zwei charakteristische Disulfidbrücken ausbilden, in zwei große Gruppen. Bei den sog. CC-Chemokinen liegen die ersten beiden N-terminalen Cysteinreste direkt nebeneinander, während sie bei den sog. CXC-Chemokinen durch eine Aminosäure X getrennt sind. Daneben gibt es zwei besondere Chemokine, das Fractalkine, bei dem die ersten beiden Cysteinreste durch drei Aminosäuren getrennt sind (CX3C-Chemokin) und das Lymphotaktin (C-Chemokin), das anstatt vier nur zwei Cysteinreste aufweist (Abbildung 9). Findet sich zwischen dem N-Terminus und dem ersten Cysteinrest eines CXC-Chemokins eine Sequenz aus Glutamat-Leucin-Arginin (ELR-Motiv), so ist das entsprechende Chemokin chemotaktisch für Neutrophile, während es ohne das ELR-Motiv chemotaktisch für Lymphozyten ist. CC-Chemokine wirken in unterschiedlichem Ausmaß auf Monozyten, Eosinophile, Basophile und Lymphozyten, zeigen dagegen aber geringe Wirkung auf Neutrophile.

Chemokine können in „homöostatische“ und „inflammatorische“ Chemokine eingeteilt werden [156]. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv sezerniert und regulieren die physiologische Wanderung von Zellen des Immunsystems während ihrer Reifung in Knochenmark und sekundären lymphatischen Geweben. Die Sekretion inflammatorischer Chemokine muss dagegen erst durch proinflammatorische Stimuli oder Kontakt zu Pathogenen induziert werden. Diese Chemokine führen zur Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und T-Lymphozyten in geschädigtes Gewebe [156]. Homöostatische Chemokine regulieren somit den Aufbau und Unterhalt des Immunsystems sowie eine allgemeine unspezifische „immune surveillance“, während inflammatorische Chemokine spezifische Immunantworten auf konkrete Schädigung hin vermitteln.

Chemokine entfalten ihre Wirkungen durch Interaktion mit Chemokinrezeptoren, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Transmembran-Rezeptoren gehören. Beim Menschen gibt es sechs CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR1-6), zehn CC-Chemokinrezeptoren (CCR1-10), einen C-Chemokinrezeptor (XCR1) und einen CX3C-Chemokinrezeptor (CX3CR1) [145]. Die meisten Chemokine können an mehrere Rezeptoren binden und die meisten Chemokinrezeptoren können wiederum mehrere Chemokine der jeweiligen Familie binden. Vielfalt und Redundanz tragen damit entscheidend zur Komplexität des Chemokinsystems bei (Abbildung 9). Chemokinrezeptoren werden in unterschiedlichem Ausmaß von den einzelnen Zellen exprimiert, einige nur von bestimmten Leukozytensubspezies, andere dagegen ubiquitär. Manche Leukozyten exprimieren Chemokinrezeptoren konstitutiv, andere nur nach Stimulation. Manche Zellen exprimieren Chemokinrezeptoren auch in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungs- und Differenzierungsgrad. So werden beispielsweise CXCR3 und CCR5 von aktivierten Th1-Lymphozyten, CCR3, CCR4 und CCR8 dagegen von aktivierten Th2-Lymphozyten exprimiert. Diese dynamische Expression von Chemokinrezeptoren ermöglicht damit die selektive

Verstärkung von Th1-vermittelter zellulärer oder Th2-vermittelter humoraler Immunantwort.
Daraus ergibt sich die hohe Spezifität des Chemokinsystems.

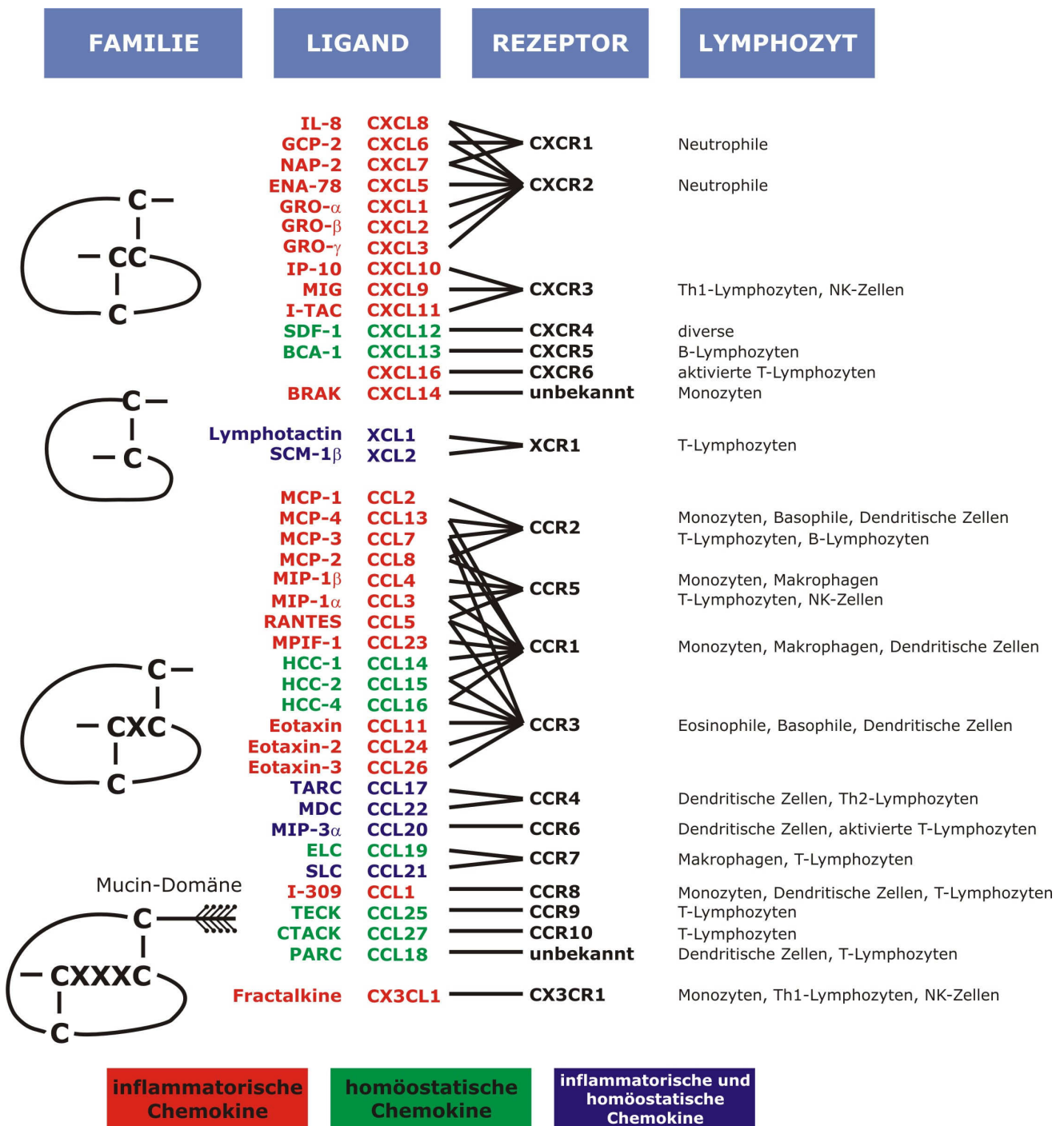


Abbildung 9: Chemokine und Chemokinrezeptoren (nach [144, 145]). Einteilung der Chemokine anhand von vier konservierten Cysteinresten am N-Terminus in CC-, CXC-, C-, CX3C-Chemokine. Die systematische Nomenklatur übernimmt diese Gruppierung und fügt ein „L“ für das Chemokin („Ligand“) bzw. ein „R“ für den entsprechenden Rezeptor an. Dargestellt sind die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten der Chemokine mit ihren jeweiligen Rezeptoren sowie die Expression der Rezeptoren auf den Leukozytensubspezies.

Chemokine interagieren darüber hinaus mit zwei weiteren Rezeptoren, die nicht an der Signaltransduktion beteiligt sind, den Heparansulfatproteoglykanen und dem *Duffy antigen* (DARC). Sezernierte Chemokine binden an das negativ geladene Heparansulfat in der extrazellulären Matrix und auf der Oberfläche des Endothels, werden so den im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten präsentiert und bauen einen Chemokingradienten auf [170, 182]. Überschüssige Chemokine werden durch DARC, einem Rezeptor auf Endothelzellen und Erythrozyten, wieder aus der Zirkulation entfernt. DARC wurde erstmals in Erythrozyten als Rezeptor für das Plasmodium vivax identifiziert, bindet aber auch die meisten Chemokine, ohne jedoch eine Signalaktivität zu entfalten [159].

2.2.2 Chemokinwirkungen

Die bedeutendste Funktion der Chemokine ist ihre Fähigkeit, Leukozyten zu rekrutieren. Die Migration von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe ist ein mehrstufiger Prozess, der die Anlagerung der Leukozyten an das Endothel, die feste Adhäsion und schließlich die Transmigration umfasst [111].

Eine erste Anlagerung an das Endothel wird vermittelt durch Selektine, die von Leukozyten und Endothelzellen exprimiert werden. In entzündlichem Gewebe exprimiert das Endothel PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand*), den Liganden für Selektine. Daraufhin können sich Leukozyten an das Endothel anlagern. Diese Bindungen sind aber so schwach, dass sie innerhalb kurzer Zeit wieder gelöst werden. Die Scherkräfte des Blutes führen jedoch dazu, dass immer neue Bindungen entstehen und die Leukozyten damit locker an die Endotheloberfläche gebunden bleiben, während sie durch den Blutstrom langsam weiter transportiert werden. Es entsteht so das Bild eines auf der Oberfläche des Endothels „rollenden“ Leukozyten. Während einer Entzündung werden Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine aktiviert, exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle und sezernieren Chemokine. Diese Chemokine steigern die Affinität von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche für endotheliale Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Damit werden die Leukozyten einerseits fest an das Endothel gebunden, andererseits wird damit eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Konformationsänderung der Endothelzelle führt. Dadurch entstehen zwischen den Endothelzellen Spalten, in die Leukozyten einwandern können. Dort binden sie an weitere, nun demaskierte Adhäsions- und Signalmoleküle, die die weitere Migration durch das Endothel schließlich bewirken (Abbildung 10) [139].

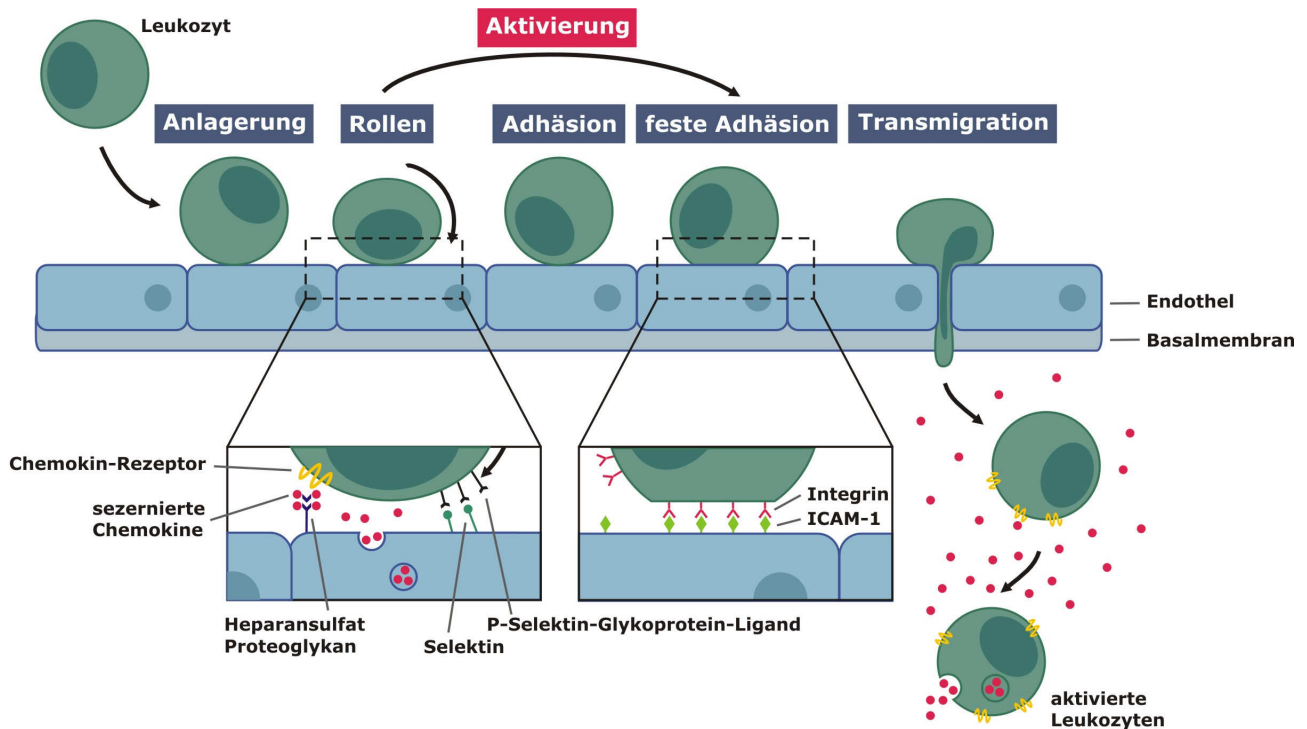


Abbildung 10: Leukozytenrekrutierung (nach [139, 144]). Am Ort einer Schädigung werden Chemokine sezerniert, die drauffin an Heparansulfat-Proteoglykane binden und so einen Gradienten aufbauen. Leukozyten lagern sich, dem Gradienten folgend, an die Gefäßwand an und liefern aufgrund kurzfristiger Bindungen an Selektine das Bild „rollender“ Leukozyten. Dies ermöglicht die Bindung der sezernierten Chemokine an die entsprechenden Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten, die daraufhin Integrine exprimieren. Integrine und ICAM-1 vermitteln schließlich die feste Anheftung und die Transmigration der Leukozyten. Eingewanderte Leukozyten werden durch Chemokine aktiviert und sezernieren daraufhin ihrerseits Chemokine, was den Entzündungsprozess weiter unterhält.

Chemokine sind auch an der Regulation der Hämatopoese beteiligt. Während der Fetalentwicklung erfolgt die Blutbildung in Leber und Milz (hepatolienale Hämatopoese), später im Knochenmark (medulläre Hämatopoese). Die Wanderung hämatopoetischer Stammzellen ins Knochenmark wird durch Chemokine gesteuert. Eine Schlüsselrolle spielt hier das SDF-1, das von Stromazellen des Knochenmarks konstitutiv exprimiert wird und durch Bindung an seinen Rezeptor CXCR4 die Einwanderung von hämatopoetischen Progenitorzellen und Stammzellen ins Knochenmark steuert [160]. Durch die konstitutive Sekretion von SDF-1 wird ein lokaler Gradient aufrechterhalten, der Stammzellen im Knochenmark zurückhält, ein für die Blutbildung entscheidender Faktor, da die für die Blutbildung erforderlichen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren im Knochenmark gebildet werden [31].

Manche Chemokine spielen eine bedeutende Rolle bei Infektionskrankheiten. *Plasmodium vivax* nützt beispielsweise DARC als Co-Rezeptor, um in Erythrozyten eindringen zu können [98]. Ähnlich das HI-Virus, das, um in die Wirtszelle eindringen zu können, mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle interagiert. Neben CD4 sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 als Co-Rezeptoren an diesem Prozess beteiligt. Ihre Liganden, RANTES und SDF-1, sind dagegen in der Lage, das Eindringen des HI-Virus in die Wirtszelle zu

verhindern [16, 32]. So sind etwa Menschen, die aufgrund eines Genpolymorphismus kein funktionales CCR5 exprimieren, vor einer progredienten Infektion weitgehend geschützt [189].

Chemokine können die Angiogenese sowohl fördern als auch hemmen. CXC-Chemokine mit ELR-Motiv wirken über ihren auf Endothelzellen exprimierten Rezeptor CXCR2 proangiogenetisch, indem sie die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördern, deren Apoptose dagegen hemmen. Im Gegensatz dazu wirken CXC-Chemokine ohne ELR-Motiv über ihren Rezeptor CXCR3 antiangiogenetisch [148].

Chemokine spielen zudem eine Rolle bei Allergien und Autoimmunprozessen [11]. So führen etwa RANTES, MCP-3 und Eotaxin über Bindung an ihren Rezeptor CCR3 zur Einwanderung von Eosinophilen, Basophilen und Th2-Lymphozyten. Eosinophile und Basophile werden aktiviert und setzen Mediatoren wie Histamin und Leukotriene frei, was wiederum zur Kontraktion glatter Muskulatur, zur Steigerung der Gefäßpermeabilität, zu gesteigerter Schleimproduktion und zur Hyperreagibilität führt. Th2-Lymphozyten tragen durch Produktion proinflammatorischer Zytokine wie dem IL-4 zusätzlich zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei.

Aufgrund dieser regulatorischen Funktionen sind Chemokine an der Pathogenese einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen beteiligt, etwa der Rheumatoiden Arthritis, dem Systemischen Lupus Erythematoses, der Psoriasis, der Arteriosklerose, der Multiplen Sklerose, oder der Transplantatabstoßung [71, 219].

2.2.3 MCP-1

Im Jahre 1988 wurde aus glatten Muskelzellen der Aorta von Pavianen erstmals ein Chemokin isoliert, das später aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Monozyten die Bezeichnung *monocyte chemoattractant protein-1* (*Mcp-1*) erhielt [218]. In Anlehnung an die internationale Nomenklatur für Chemokinrezeptoren [157] wurden auch für deren Liganden systematische Bezeichnungen eingeführt. Dementsprechend erhielt das Mcp-1 die Bezeichnung Ccl2, wobei die Schreibweise MCP-1/CCL2 für das menschliche MCP-1 und die Schreibweise Mcp-1/Ccl2 für das murine Mcp-1 verwendet wird.

Die Tertiärstruktur des MCP-1 zeigt typische Merkmale der CC-Chemokine: ein irreguläres β -Faltblatt am N-Terminus, ein sog. „greek key motif“ aus drei antiparallelen β -Faltblättern und eine α -Helix am C-Terminus [181]. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass MCP-1 in zwei verschiedenen Kristallformen auftritt, einer monomeren I-Form und einer dimeren P-Form (Abbildung 11), die jeweils unterschiedliche Quartärstrukturen bilden [143]. Die Bedeutung der unterschiedlichen Quartärstrukturen für die biologische Funktion des MCP-1 ist jedoch unklar [169, 234].

Der einzige Rezeptor für MCP-1 ist CCR2, der jedoch neben MCP-1 auch MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7 und MCP-4/CCL13 binden kann. CCR2 wird konstitutiv exprimiert auf Basophilen, Monocyten, Dendritischen Zellen und NK-Zellen. T-Lymphozyten exprimieren CCR2 dagegen erst nach Stimulation durch Interleukin-2. Darüber hinaus kann die Expression von CCR2 durch Einwirkung von LPS herunterreguliert werden [144]. Entsprechend der Verteilung des CCR2 auf den einzelnen Leukozytensubspezies ergeben sich die Wirkungen des MCP-1: es wirkt chemotaktisch auf Monozyten sowie CD4- und CD8-positive T-Gedächtniszellen und führt zur Freisetzung von Granula in NK-Zellen und Histamin in Basophilen.

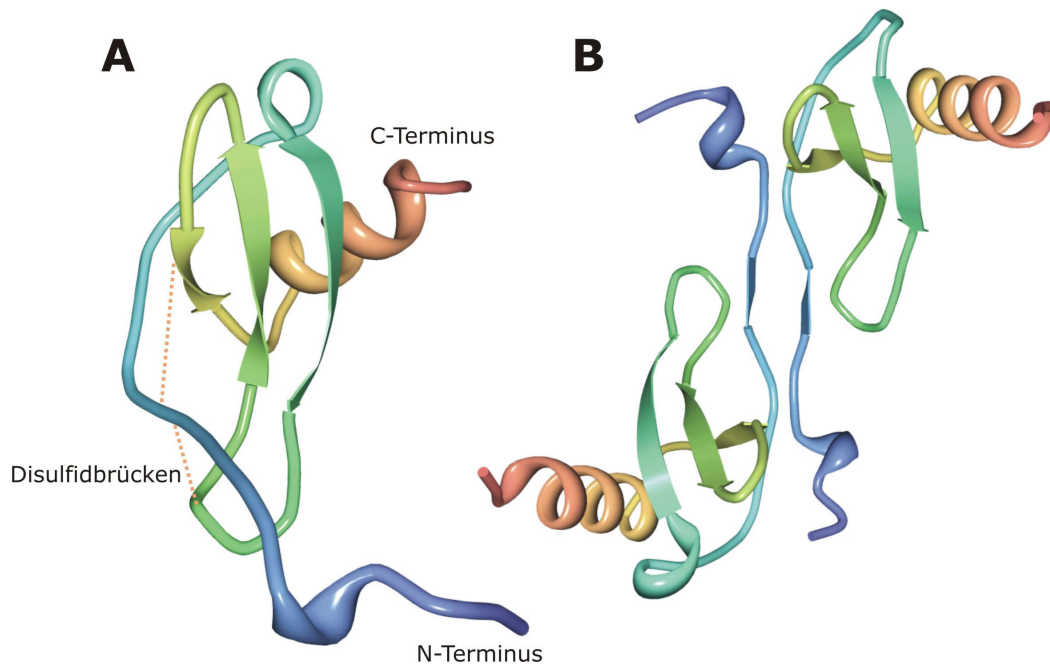


Abbildung 11: Tertiärstruktur von MCP-1 (nach [143]). Dargestellt sind die monomere I-Form (A) sowie die dimere P-Form (B).

Proinflammatorische Chemokine wie MCP-1 werden nur transient sezerniert, d.h. nur wenn ein entsprechender Stimulus vorhanden ist. [198]. Typische Stimuli sind proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$, Immunkomplexe, reaktive Sauerstoffspezies, Wachstumsfaktoren, Angiotensin II und Pathogen-assoziierte Moleküle wie Lipopolysaccharide. Um eine chronische Entzündungsreaktion zu verhindern, muss die Sekretion proinflammatorischer Chemokine auch wieder beendet werden, etwa durch Zytokine wie IL-10 und $\text{TGF-}\beta$, Prostaglandine oder Glucocorticoide [198].

Um die Rolle von MCP-1 näher zu charakterisieren, wurden bisher zahlreiche Studien zur *in vivo*-Blockade von MCP-1 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von transfizierten Zellen, die eine inaktive Form von MCP-1 exprimieren, die renale Entzündung in einem Modell der Lupusnephritis unterdrücken kann [93]. Auch die Transfektion mit 7ND, einer Mutante von MCP-1 kann die Entzündung in Tiermodellen der Lupusnephritis oder der diabetischen Nephropathie reduzieren [116, 201]. Mcp-1-defiziente Mäuse zeigen sowohl im

Modell des Typ 1 Diabetes wie auch im Modell des Typ 2 Diabetes eine Verlangsamung der Progression der diabetischen Nephropathie mit Reduktion der Glomerulosklerose und der interstitiellen Fibrose [28, 29]. Kulkarni et al. konnten in einem Modell der Lupusnephritis nachweisen, dass durch die Blockade von Mcp-1 das Überleben verlängert und die entzündliche Gewebeschädigung reduziert werden kann [132]. Zur Blockade von Mcp-1 verwendeten sie einen neuartigen Antagonisten, ein sog. Spiegelmer.

2.3 Spiegelmerttechnologie

2.3.1 Aptamere

Nukleinsäuren sind nicht nur Träger der Erbinformation, sondern Teil katalytischer und regulatorischer Prozesse, denn einzelsträngige Nukleinsäuren (RNA oder ssDNA) sind in der Lage, sich zu falten und spezifische dreidimensionale (Sekundär- und Tertiär-)Strukturen anzunehmen, ähnlich den Proteinen [34]. Durch die Ausbildung von Schleifen, Ausbuchtungen, Pseudoknoten oder Haarnadelschleifen kommt es zur Bildung von Bindungstaschen für spezifische Liganden. Einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere, die, ähnlich den monoklonalen Antikörpern, mit hoher Affinität an spezifische Liganden binden, wurden erstmals 1990 beschrieben. Man gab ihnen die Bezeichnung Aptamere (lat. *aptus*, *passend*, gr. *meros*, *Partikel*) [47].

2.3.2 SELEX

Die Erzeugung von Aptameren mittels des so genannten SELEX-Prozesses (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) wurde 1990 zeitgleich von Ellington et al. [47] und Tuerk et al. für RNA-Aptamere [214] entwickelt und 1992 auch zur Gewinnung von DNA-Aptameren angepasst [48]. SELEX beruht auf der mehrfach wiederholten *in vitro* Selektion und Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen (Abbildung 12). Dieses zyklische Verfahren imitiert damit einen Evolutionsprozess [73], an dessen Ende nur wenige, aber für ein bestimmtes Ziel optimierte Sequenzen entstehen, die Aptamere.

In einem ersten Schritt wird durch chemische Synthese eine Oligonukleotid-Bibliothek aus etwa 10^{13} bis 10^{15} verschiedenen Molekülen mit jeweils zufälliger Sequenz generiert. Die zufälligen Sequenzen, die etwa 20 bis 80 Basenpaare umfassen, werden flankiert von kurzen spezifischen Sequenzen, die später als Bindungsstellen für die PCR dienen. Die so erzeugten Nukleinsäuresequenzen, entweder einzelsträngige DNA oder RNA, werden mit dem gewünschten Zielmolekül inkubiert. Als Zielmoleküle können dabei neben anorganischen und organischen Molekülen auch Proteine, Kohlenhydrate, einzelne Zellen oder ganze Organismen dienen. Einige der Oligonukleotide können daraufhin an das gegebene Zielmolekül binden und

werden anschließend mittels PCR (DNA-SELEX) bzw. RT-PCR (RNA-SELEX) amplifiziert, während andere, die nicht an das Ziel gebunden hatten, verworfen werden. Die so entstandene doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgetrennt (DNA-SELEX) oder *in vitro* transkribiert und aufgereinigt (RNA-SELEX), um einzelsträngige Nukleinsäuresequenzen für einen erneuten Selektions-Amplifikations-Zyklus zu gewinnen.

Bei jedem Zyklus reduziert sich dabei die Komplexität, d.h. die Anzahl verschiedener gebundener Oligonukleotide bis am Ende wenige Sequenzen übrig bleiben, die aber höchste Affinität und Spezifität im Hinblick auf das Zielmolekül besitzen. Nach etwa 6 bis 20 Selektionszyklen ist keine Steigerung der Affinität mehr möglich, so dass im Anschluss an die letzte Amplifikation die Sequenzen abschließend geklont werden und zur genaueren Charakterisierung Sequenz- und Bindungsanalysen durchlaufen.

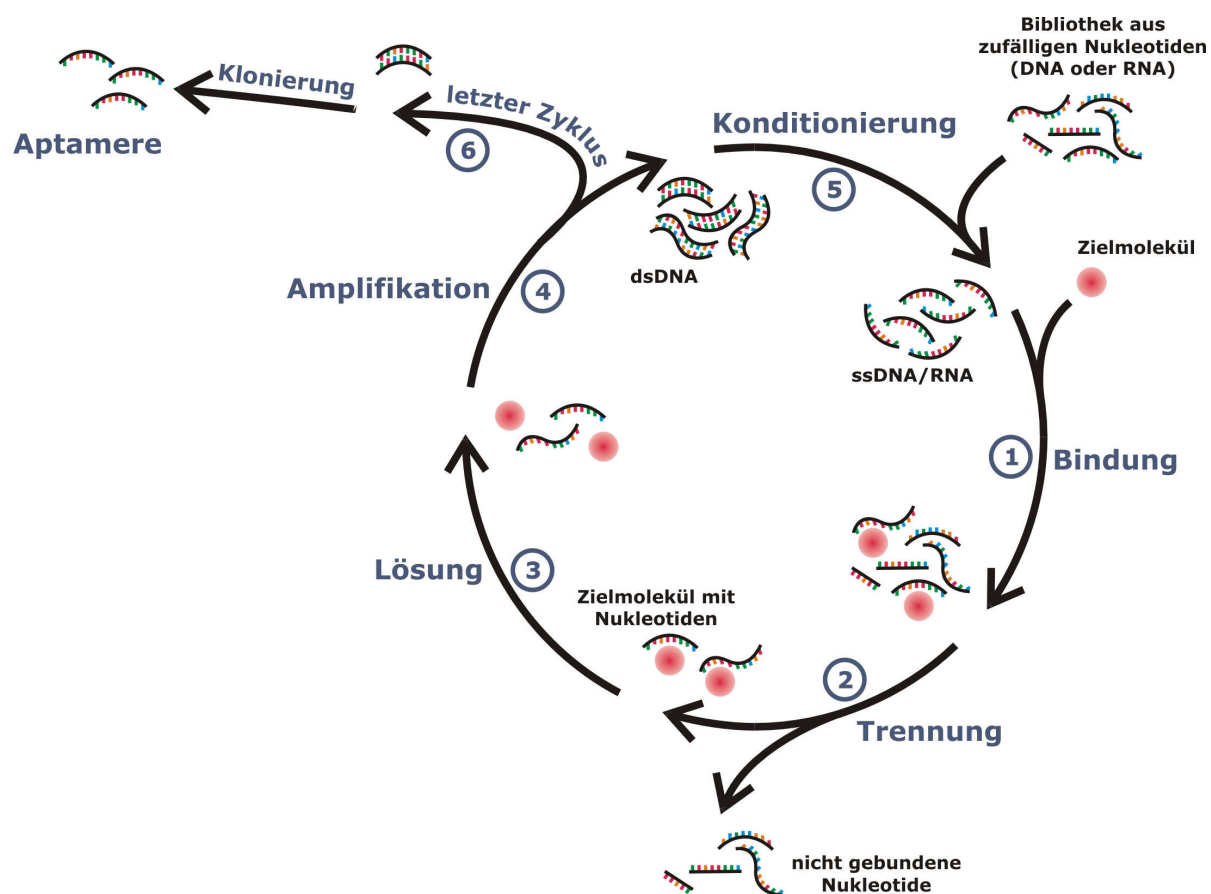


Abbildung 12: Vereinfachte Darstellung der SELEX-Technologie (nach [205]). Der SELEX-Prozess ist ein mehrfach durchgeführter Zyklus bestehend aus Selektion und Amplifikation. Ein Zielmolekül wird mit chemisch synthetisierten, aus zufälligen (etwa 10^{15} verschiedenen) Sequenzen bestehenden Nukleotiden (einzelsträngige DNA oder RNA) inkubiert (1). Einige der Nukleotide sind in der Lage das Zielmolekül zu binden, während andere dazu nicht in der Lage sind und verworfen werden (2). Die gebundenen Nukleotide werden vom Zielmolekül gelöst (3) und mittels PCR bzw. RT-PCR amplifiziert (4), abhängig davon, ob das Ausgangsmaterial DNA oder RNA darstellte. Die dabei entstehende doppelsträngige DNA wird für einen erneuten Zyklus aufbereitet (Konditionierung), d.h. wieder in einzelsträngige DNA oder RNA überführt (5), die nun das Ausgangsmaterial für einen erneuten Zyklus darstellen. Am Ende eines jeden Zyklus hat sich die Zahl der entstehenden Nukleotide reduziert, deren Affinität und Spezifität aber erhöht. Nach etwa 6 bis 20 Zyklen erhält man hochaffine, Zielmolekülspezifische Aptamere, die unmittelbar nach der letzten Amplifikation kloniert und weiter charakterisiert (Sequenzierung, Sequenzanalyse, Bindungsstudien, Modifikationen, etc.) werden (6).

Die Eigenschaften der Aptamere können bereits während des SELEX-Prozesses verändert werden, indem die Reaktionsbedingungen etwa durch Zugabe bestimmter Puffer angepasst werden. Daneben ist es auch möglich, so genannte Post-SELEX-Modifikationen durchzuführen. So kann beispielsweise die 2'-Hydroxylgruppe des Riboserückgrats ausgetauscht werden, um eine größere Nukleasestabilität zu erreichen oder eine Art „Kappe“ am 3'-Ende des Aptamers angebracht werden, um sie vor dem Abbau durch Exonukleasen zu schützen. Ebenso möglich ist die Addition von funktionellen Gruppen, etwa fluoreszierenden Gruppen, mit deren Hilfe die Aptamere später detektiert werden können.

Trotz ihrer aufwendigen Herstellung und ihrer geringen Stabilität in biologischen Flüssigkeiten haben Aptamere enorme Vorteile, gerade im Vergleich zu Antikörpern (Abbildung 13).

Das erste kommerziell verfügbare und als Arzneimittel zugelassene Aptamer ist das Pegaptanid (Macugen®). Dieser Antagonist des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) kann erfolgreich bei der altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt werden [74].

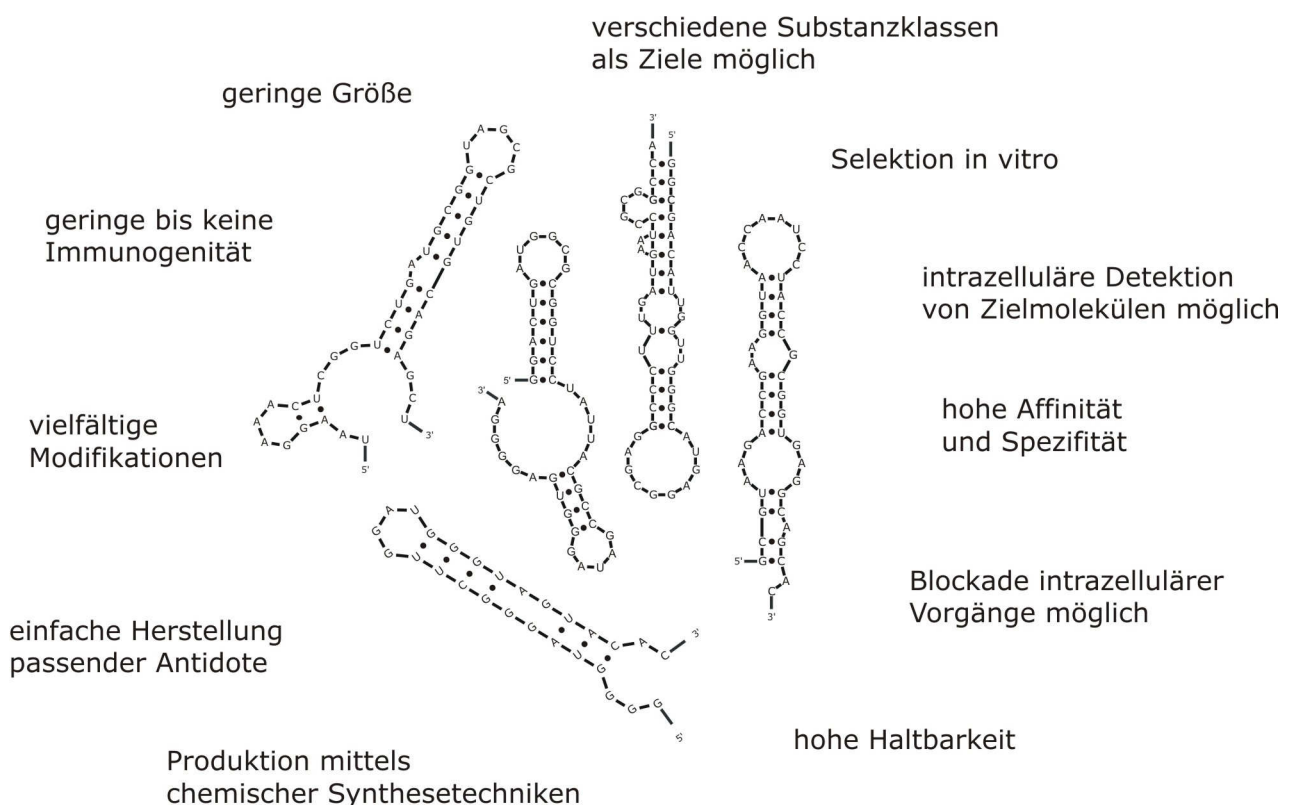


Abbildung 13: Vorteile von Aptameren [205]. Dargestellt sind beispielhaft die Sekundärstrukturen von fünf Aptameren [241].

2.3.3 Spiegelmere

Aptamere sind in biologischen Flüssigkeiten, wie etwa menschlichem Blut, sehr instabil, da sie aus natürlich vorkommenden Bausteinen bestehen. Ubiquitär vorhandene Nukleasen bauen Aptamere, die man Versuchstieren injiziert, innerhalb weniger Sekunden ab, noch ehe sie ihre gewünschte Wirkung erzielen können [77]. Um Aptamere gegenüber enzymatischer Degradation resistenter zu machen, könnte man sie nach dem SELEX-Prozess modifizieren, beispielsweise einzelne funktionale Gruppen ersetzen. Eleganter ist eine 1996 entwickelte Methode zur Herstellung so genannter Spiegelmere, bei der man sich die Chiralität organischer Moleküle zu Nutze macht [127, 165].

Unter Chiralität (gr. *cheir*, *Hand*) versteht man eine Form der Stereoisomerie, bei der ein zentrales Atom, das Chiralitätszentrum, vier verschiedene funktionelle Gruppen bindet, die jeweils die Ecken eines Tetraeders bilden. Es entstehen so zwei Moleküle, die durch Drehung nicht zur Deckung zu bringen sind, sich also wie Bild und Spiegelbild verhalten. Man nennt diese spiegelbildlichen Moleküle Enantiomere (Abbildung 14).

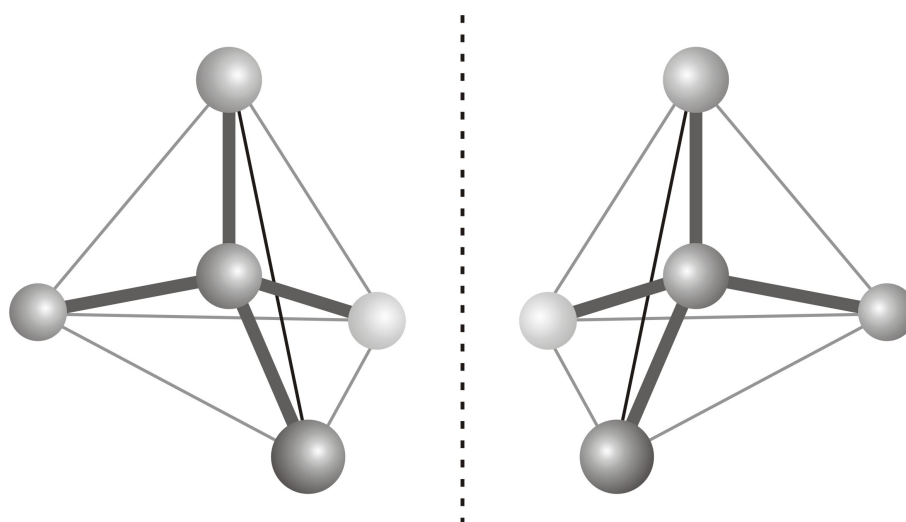


Abbildung 14: Chiralität (nach [220]). Die dargestellten Moleküle lassen sich durch Drehung nicht zur Deckung bringen, d.h. sie verhalten sich wie Bild und Spiegelbild. Die vier an das Chiralitätszentrum gebunden Gruppen bilden dabei die Ecken eines Tetraeders.

Natürlich vorkommende Nukleinsäuren sind D-konfiguriert. Nukleasen, die selbst aus Aminosäuren in L-Konfiguration bestehen, können auch lediglich D-konfigurierte Nukleinsäuren erkennen und enzymatisch abbauen. L-Nukleinsäuren wären demnach biostabil, jedoch fehlt es an geeigneten Enzymen, mit deren Hilfe man derart konfigurierte Nukleinsäuren synthetisieren könnte.

In der Natur vorkommende Proteine, die als potenzielle Zielmoleküle für den SELEX-Prozess dienen können wie etwa MCP-1, bestehen aus Aminosäuren in L-Konfiguration. Es ist jedoch möglich, Proteine zu synthetisieren, die aus D-konfigurierten Aminosäuren bestehen und

natürlicherweise nicht vorkommen. Ein solches Protein kann nun in einem SELEX-Prozess als Zielmolekül angeboten werden, woraufhin spezifische Aptamere selektiert werden können, die selbst D-konfiguriert sind. Den Gesetzen der Chiralität folgend kann das Enantiomer dieses Aptamers, das aus L-konfigurierten Nukleotiden synthetisiert wird, nun auch das Enantiomer des D-konfigurierten Zielmoleküls, d.h. das eigentlich gewünschte L-konfigurierte Protein binden. Dieses „gespiegelte“ Aptamer nennt man Spiegelmer (Abbildung 15).

Da Spiegelmere aus natürlich nicht vorkommenden L-Nukleotiden bestehen, sind Nukleasen nicht in der Lage, sie abzubauen. Spiegelmere sind demnach nukleaseresistente, biostabile Aptamere. Sie unterscheiden sich in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften von den enantiomeren Aptameren nur hinsichtlich ihrem Verhalten in polarisiertem Licht und ihrem Interaktionsverhalten mit anderen chiralen Molekülen [55]. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Spiegelmere allenfalls gering immunogen sind [227]. Weder in präklinischen [44] noch in Phase-I-Studien [56] konnten bisher toxische Wirkungen von Spiegelmeren nachgewiesen werden.

Bisher wurde eine Reihe von Spiegelmeren *in vitro* und *in vivo* getestet, darunter Spiegelmere gegen Amylin [15], Ghrelin [13, 95, 128], CGRP [42], Substanz P [54], Nociceptin [57], GnRH [227], Vasopressin [175] und MCP-1 [132].

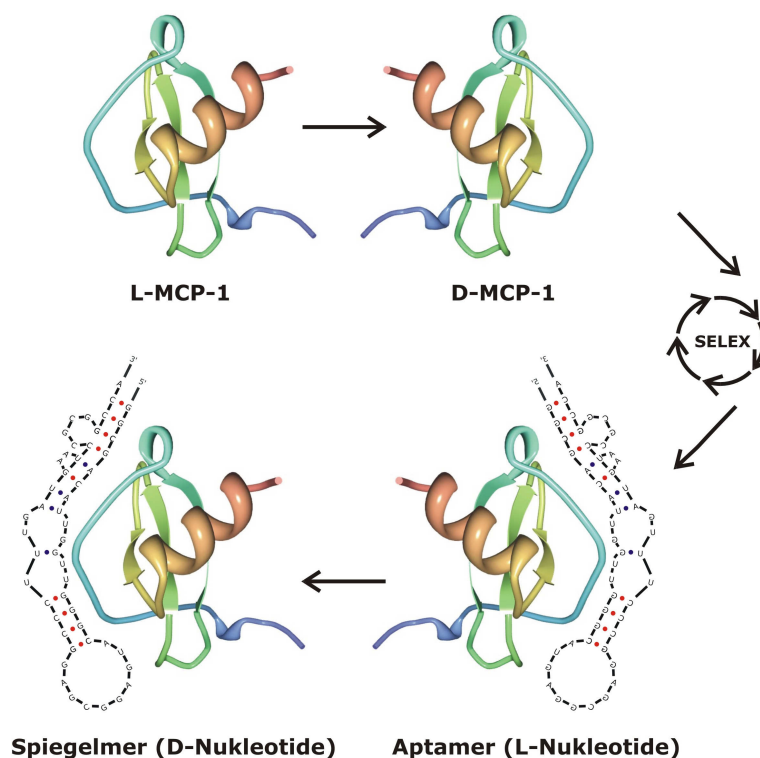


Abbildung 15: Spiegelmer-Technologie. Das gewünschte Zielprotein aus L-Aminosäuren wird „gespiegelt“, d.h. aus D-Aminosäuren synthetisiert. Dieses Protein dient in einem SELEX-Prozess als Zielmolekül. Es resultiert ein Oligonukleotid aus D-Nukleinsäuren, ein Aptamer, das an das gespiegelte Protein binden kann. Entsprechend der Chiralität kann ein aus L-Nukleotiden neu synthetisiertes, „gespiegeltes“ Oligonukleotid an das ursprüngliche Protein (A) binden, ein Spiegelmer.

2.4 Hypothese

Chemokine scheinen eine bedeutende Rolle bei der Progression der chronischen Niereninsuffizienz zu spielen. Mit der Blockade von CCR1 konnte lediglich die tubulointerstitielle Makrophageninfiltration verringert werden. MCP-1 vermittelt neben der tubulointerstitiellen auch die glomeruläre Makrophagenrekrutierung. Mit mNOX-E36-3'PEG steht ein neuartiger und vielversprechender Antagonist zur Verfügung, dessen Wirksamkeit bei der Lupusnephritis bereits gezeigt werden konnte.

Wir vermuteten daher, dass mNOX-E36-3'PEG auch bei der diabetischen Nephropathie von db/db-Mäusen und der Nephropathie von Alportmäusen effektiv ist. Eine Reduktion der glomerulären und tubulointerstitiellen Makrophageninfiltrate sollte demnach mit einer Progressionsverlangsamung, geringerer Gewebeschädigung und verlängerter Überlebenszeit assoziiert sein.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tierhaltung

Makrolone Typ II Käfige	Tecniplast, Hamburg
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest
db/db-Mäuse	Taconic, Ry, Dänemark
COL-IV- α_3 -defiziente Mäuse	wurden zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. O. Gross, Göttingen

3.1.2 Geräte

Waagen	
Analytische Waage, BP 110 S	Sartorius, Göttingen
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Inkubatoren	
Type B5060 EC-CO ₂	Heraeus Sepatech, München
Zentrifugen	
Heraeus, Biofuge primo	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt
Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, München
ELISA-Reader	
Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
Mikroskope	
Leica DC 300F	Leica Microsystems, Cambridge, UK
Olympus BX50	Olympus Microscopy, Hamburg
Spectrophotometer	
Beckman DU® 530	Beckman Coulter, Fullerton, USA
TaqMan Sequence Detection System	
ABI prism™ 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt
Sonstiges	
Cryostat RM2155	Leica Microsystems, Bensheim
Cryostat CM3000	Leica Microsystems, Bensheim
Glucometer Accu check Sensor	Roche, Mannheim
Homogenizer ULTRA-TURRAX T25	IKA GmbH, Staufen
Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim
Robot MicroBeam System	P.A.L.M., Wolfratshausen

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Bensheim

3.1.3 Chemikalien

Chemikalien für die Genotypisierung der COL4A3-Mäuse	
1kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	GE Healthcare, Freiburg
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
Superscript	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNAPolymerase	Minerva BioLabs, Berlin
Chemikalien für molekularbiologische Techniken	
Elisa-Kit (Albumin)	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
Elisa-Kit (Mcp-1)	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RT-PCR primers	PE Biosystems, Weiterstadt
TaqMan® universal PCR master mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Chemikalien für die Zellkultur	
DMEM-medium	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's PBS (1×)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
FSC	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (100×)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPMI-1640 medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Trypsine/EDTA (1×)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Primär-Antikörper	
Schaf anti-Ccl2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ratte anti-CD3	BD Pharmingen, Hamburg
Ratte anti-F4/80	Serotec, Oxford, UK
Ratte anti-Ki-67	Dianova, Hamburg
Ratte anti-Mac2	Cederlane, Ontario, Canada
Ratte anti-MECA-32	University of Iowa, Hybridoma Bank, USA

Sekundär-Antikörper	
anti-Maus IgG1, IgG2a, IgG2b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-Ratte IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Schaf IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Chemikalien für die Lasermikrodissektion	
Cyanacrylatkleber	UHU, Buehl
mineralisches Öl	Fluka Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Sonstiges	
anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Mac2-FITC-Konjugat	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
CellTiter 96 Proliferation Assay	Promega, Mannheim
Fluorescence-labeled microspheres (0.96 µm FluoSpheres)	Molecular Probes™/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
LS ⁺ /VS ⁺ Positive Selektionssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kanülen	BD Drogheda, Irland
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim
Plastik Histosette	NeoLab, Heidelberg
Separationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SuperFrost® Plus microscope slides	Menzel-Gläser, Braunschweig
Silverfärbekit	Bio-Optica, Mailand, Italien
Kit zum Nachweis von Kreatinin	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim
Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Tissue culture dishes Ø 100x20mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Tissue culture dishes Ø 150x20mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Tissue culture dishes Ø 35x10mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Tissue culture flasks 150 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Tubes 15 and 50 mL	TPP, Trasadingen, Schweiz
Tubes 1.5 and 2 mL	TPP, Trasadingen, Schweiz
Chemikalien	
Aceton	Merck, Darmstadt
AEC Substrat Packung	Biogenex, San Ramon, USA
Äther	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim
DEPC	Fluka, Buchs, Schweiz
DMSO	Merck, Darmstadt
Diluent C für den PKH26-Farbstoff	Sigma-Aldrich Chemicals, Steinheim

EDTA	Calbiochem, SanDiego, USA
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Hydroxyethyl Cellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
HCl (5N)	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Roti-Aqua-Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SSC (Saline-sodium citrate Puffer)	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Tissue Freezing Medium	Leica, Nussloch
Trypan Blue	Sigma, Deisenhofen
Oxygenated water	DAKO, Hamburg
Xylol	Merck, Darmstadt
Alle anderen analytisch verwendeten Reagenzien sind kommerziell erhältlich bei Invitrogen, Sigma oder Roth.	

3.1.4 Lösungen

Anästhesie-Lösung	10 ml Midazolam (1 mg/ml) 2 ml Fentanyl (0,05 mg/ml) 1 ml Dormitor (1 mg/ml)
Antagonisten-Lösung	5 ml Anexate (0,1 mg/ml) 0,5 ml Antisedan (5 mg/ml) 3 ml Naloxon (0,4 mg/ml)

10x Citratpuffer	110 mM Natriumcitrat in ddH ₂ O lösen mittels NaOH auf pH 6,0 einstellen
Lösung D	4 M Guanidinium Thiocyanat 25 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 0,5 % Sarcosyl 0,1 M β -Mercaptoethanol
6x Glycerin-Ladepuffer (6x LB)	0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanoblau Glycerol Wasser
MACS Puffer	PBS pH 7,2 0,5 % BSA 2 mM EDTA
PBND-Puffer	2 M KCl 1 M TRIS-HCl (pH 8,3) 1 M MgCl ₂ 0,1 % w/v gelatin bzw. 1 ml 1 % w/v gelatin 100 % NP40 100 % Tween20 Wasser
20x PBS	2,74 M NaCl 54 mM KCl 30 mM KH ₂ PO ₄ 130 mM Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O lösen und mittels HCl auf pH 7,5 einstellen
TBE-Puffer	89 mM TRIS 89 mM Borsäure 2 mM EDTA in ddH ₂ O lösen und mittels HCl auf pH 8,0 einstellen

3.1.5 Oligonukleotid-Primer und -proben für die RT-PCR

Es wurden folgende Oligonukleotid-Primer (300 nM) und –Proben (100 nM) verwendet:

Ccr1	Forward primer	5'-TTAGCTTCCATGCCTGCCTTATA-3'
	Reverse primer	5'-TCCACTGCTTCAGGCTCTTGT-3'
	Internal fluorescence labeled probe (FAM)	5'-ACTCACCGTACCTGTA-GCCCTCATTTCCC-3'

Ccr2	Forward primer	5'- CCTTGGGAATGAGTAACTGTGTGA -3'
	Reverse primer	5'- ACAAAGGCATAAATG-ACAGGATTAATG - 3'
	Internal fluorescence labeled probe (FAM)	5'- TGACAAGCACTTA-GACCAGGCCATGCA -3'
Tgf- β 1	Forward primer	5'- CACAGTACAGCAAGGTCCTTGC-3'
	Reverse primer	5'- AGTAGACGATGGGCAGTGGCT-3'
	Internal fluorescence labeled probe (FAM)	5'- GCTTCGGCG-TCACCGTGCT-3'
CollagenI- α 1	Forward primer	5'- TGCTTTCTGCCCCGGAAGA-3'
	Reverse primer	5'- GGGATGCCATCTCGTCCA-3'
	Internal fluorescence labeled probe (FAM)	5'- CCAGGGTCTC-CCTGGGTCCTACATCT -3'
mGAPDH	Forward primer	5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3'
	Reverse primer	5'-ATGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'
	Internal fluorescence labeled probe (VIC)	5'-CCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
Ccl2		vorgefertigte TaqMan-Reagenz von PE Biosystems, Weiterstadt
18s rRNA		vorgefertigte TaqMan-Reagenz von PE Biosystems, Weiterstadt

3.1.6 Oligonukleotid-Primer für die Genotypisierung der COL4A3^{-/-}-Mäuse

oIMR0642	wildtype primer	5'-CCTGCTAATATAGGGTTCGAGA-3'
oIMR0643	knockout primer	5'-CCAGGCTTAAAGGGAAATCC-3'
oIMR1100	neo primer	5'-GCTATCAGGACATAGCGTTGG-3'

3.1.7 Software

ABI PRISM Sequence Detection software 1.0	Applied Biosystems
Acrobat Writer	Adobe
CellQuest	BD Biosciences
Draw 10	Corel
Endnote 10.0	Thomson
Firefox 2.0.0.12	Mozilla
Office 2003	Microsoft
Prism 5.0	GraphPad
QWin	Leica
Windows XP Professional	Microsoft

3.1.8 Spiegelmer

Das Spiegelmer mNOX-E36 bestand aus folgender Nukleotidsequenz: 5'-GGCGACAUUG GUUGGGCAUG AGGCGAGGCC CUUUGAUGAA UCCGCGGCCA-3' [132]. mNOX-E36 bindet spezifisch an Mcp-1 der Maus und inhibiert die biologische Funktion *in vitro* in geringen nanomolaren Konzentrationen. Für die Anwendung *in vivo* wurden mNOX-E36 und das nicht-funktionale Kontroll-Spiegelmer PoC (5'-UAAGGAAACU CGGUCUGAUG CGGUAGCGCU GUGCAGAGCU-3') durch Anfügen von 40-kDa Polyethylenglykol (PEG) modifiziert.

Die Spiegelmere mNOX-E36-3'PEG und PoC-PEG wurden freundlicherweise von der NOXXON Pharma AG, Berlin zur Verfügung gestellt.

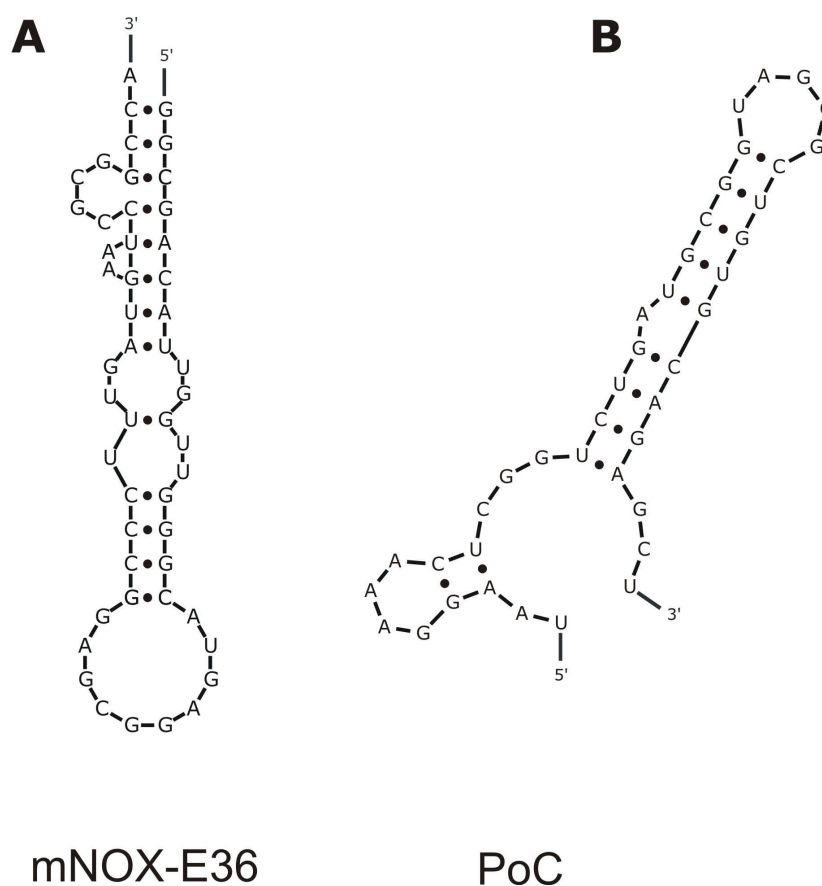


Abbildung 16: Sekundärstrukturen des Spiegelmers mNOX-E36-3'PEG (A) und des nicht-funktionellen Kontroll-Spiegelmers PoC-PEG (B) [241].

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuche

3.2.1.1 Versuchstierhaltung

Jeweils fünf Mäuse wurden in Käfigen vom Typ Makrolone Typ II bei 12-stündigem Hell-/Dunkelrhythmus und unbeschränktem Zugang zu Wasser und Futter untergebracht. Käfige, Streu, Futter und Wasser wurden vor Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert. Alle Tierexperimente wurden entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt und waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.1.2 Versuchstiere

3.2.1.2.1 db/db-Mäuse

Verwendet wurden männliche C57BLKS/J^{Lepr}-Mäuse, die aufgrund einer genetischen Veränderung des Leptinrezeptors kein Sättigungsgefühl verspüren und daraufhin Übergewicht und alimentären Diabetes mellitus entwickeln.

3.2.1.2.2 COL4A3-defiziente Mäuse

3.2.1.2.2.1 Allgemeines

Kollagen-IV- α_3 -defiziente Mäuse (COL4A3^{-/-}) wurden erstmals von Dominic Cosgrove generiert [39]. Durch Einbringen einer Neomycin-Phosphotransferase-Cassette in Exon 5 des COL4A3-Gens wird die NC1-Domäne des Kollagens durchbrochen, so dass die α_3 -Kette des Kollagen-IV nicht transkribiert werden kann. Die Tiere entwickeln daraufhin die autosomal-rezessive Form des Alport-Syndroms. Im Rahmen dessen entwickeln sich eine Glomerulosklerose und intersititelle Fibrose, die zum terminalen Nierenversagen mit Urämie-bedingtem Tod mit etwa 9-10 Wochen führt.

3.2.1.2.2.2 Zucht

Kollagen-IV-defiziente Mäuse (COL4A3^{-/-}) im gemischten 129/SvJ-Hintergrund wurden unter pathogenfreien Bedingungen durch Verpaarung von heterozygoten Mäusen (COL4A3^{+/-}) gezüchtet. Die heterozygoten Zuchttiere wurden von PD Dr. med. Oliver Gross, Göttingen zur Verfügung gestellt.

3.2.1.2.2.3 Genotypisierung

Der Genotyp jeder Maus wurde mittels PCR aus genomischer DNA bestimmt, die aus den Schwanzspitzen extrahiert wurde. Um die DNA zu gewinnen, wurden jeweils 2 bis 5 mm der Schwanzspitze jeder Maus in 200 µl PBND-Puffer mit 1 µl Proteinase K (in einer Konzentration von 20 mg/ml) mindestens 4 Stunden bei 56 °C verdaut. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 13.000 U/min zentrifugiert. 1 µl des Überstands wird zu 24 µl eines PCR-Mix gegeben. Dieser besteht aus 15,1 µl Aqua ad injectabile, 2,5 µl 10x Puffer, 3,0 µl dNTP (in einer Konzentration von 1,25 µM), 1,0 µl Primer 1, 1,0 µl Primer 2, 0,2 µl Primer 3 und 0,2 µl Taq-Polymerase in einer Konzentration von 5.000 U/ml.

Die Proben durchliefen im Thermocycler folgendes Programm, wobei die Schritte 2 mit 4 jeweils 35-fach wiederholt wurden, um eine exponentielle Amplifikation zu erzielen:

Schritt	Ablauf	Temperatur	Dauer
1	initiale Denaturierung	94 °C	3 Minuten
2	Denaturierung zu Einzelsträngen	94 °C	30 Sekunden
3	Hybridisierung der Primer (Annealing)	62 °C	1 Minute
4	Elongation	72 °C	2 Minuten
5	Abschließende Polymerisation	72 °C	2 Minuten
6	Ende	4 °C	

Die vervielfältigte DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Herstellung des 1,5-%-Elektrophoresesegels wurden 1,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst und anschließend 10 µl Ethidiumbromid (in einer Konzentration von 10 mg/ml) zugegeben. Man lässt das in einen Gelträger gegossene Elektrophoresegel aushärten, entfernt die zur Bildung von taschenförmigen Vertiefungen eingesetzten Kämme und pipettiert in diese Taschen die Proben, die durch Zugabe von jeweils 4,2 µl 6x Glycerin-Ladepuffer (6xLB) gefärbt wurden. Neben den eigentlichen Proben werden eine 1kb DNA-Leiter, eine Wildtyp-Probe als Negativkontrolle, eine Knockout-Probe als Positivkontrolle und Wasser als Kontrolle für möglicherweise kontaminierten Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 150 Volt für 45 Minuten durchgeführt und das Gel abschließend unter UV-Licht fotografiert.

Zeigt sich eine einzelne Bande bei 810 bp, so handelt es sich um Wildtyp-Mäuse ohne Gendefekt, zeigt sich eine einzelne Bande bei 230 bp, so handelt es sich um eine homozygote COL4A3-Knockout-Maus, zeigen sich zwei Banden bei 810 bp und 230 bp, so handelt es sich um eine heterozygote Maus.

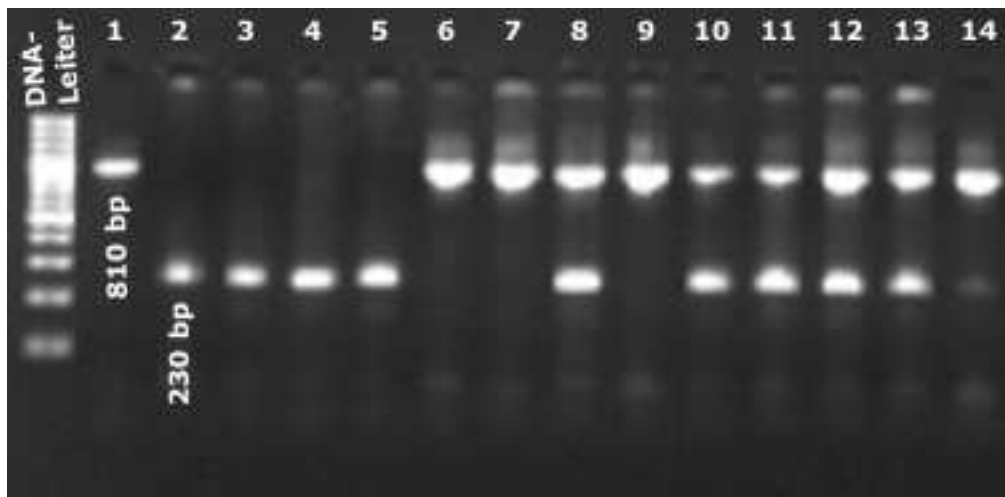


Abbildung 17: Foto einer Gelelektrophorese. Bande 1 stellt die Negativkontrolle, Bande 2 die Positivkontrolle dar. Wildtyp-Mäuse (COL4A3^{+/+}, Tiere Nr. 6, 7, 9, 14) zeigen eine einzelne Bande von 810 bp, Knockout-Mäuse (COL4A3^{-/-}, Tiere Nr. 3, 4, 5) zeigen eine einzelne Bande von 230 bp, heterozygote Mäuse (COL4A3^{+/-}, Tiere Nr. 8, 10, 11, 12, 13) zeigen zwei Banden bei 810 bp und 230 bp.

3.2.1.3 Studiendesign

3.2.1.3.1 Mcp-1-Blockade bei diabetischer Nephropathie

Um eine renale Hyperfiltration zu induzieren und damit die Entwicklung der Diabetes-bedingten Nierenschädigung zu beschleunigen, wurde den db/db-Mäusen im Alter von 6 Wochen in Allgemeinanästhesie jeweils eine Niere entnommen (Uninephrektomie, 1K-Mäuse) bzw. in der Kontrollgruppe in situ belassen (Sham-Operation, 2K-Mäuse). Zu Beginn der Operation wird eine Narkosemischung angesetzt, bestehend aus einem Barbiturat zur Hypnose, einem Benzodiazepin zur Sedierung und Muskelrelaxation sowie einem Opiat zur Analgesie. Dazu werden zu 13 ml physiologischer Kochsalzlösung 1 mg Medetomidin, 10 mg Midazolam und 0,1 mg Fentanyl gegeben. Neben der Narkosemischung bereitet man auch eine Antagonistenmischung zu, bestehend aus 2,5 mg Atipamezol, 0,5 mg Flumazenil und 1,2 mg Naloxon, die man zu 8,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gibt. Zur Narkoseeinleitung werden gewichtsadaptiert zwischen 130 und 200 µl der Narkosemischung intraperitoneal verabreicht, so dass die Dosis der jeweiligen Substanzen 0,5 mg pro kg Körpergewicht Medetomidin, 5 mg pro kg Körpergewicht Midazolam sowie 0,05 mg pro kg Körpergewicht Fentanyl entspricht. Nach etwa 10 bis 20 Minuten ist eine ausreichende Toleranz für chirurgische Eingriffe für mindestens eine Stunde gegeben. Während der Narkose wird das Tier mittels Wärmelampe gewärmt und mit Bepanthen-Augensalbe zur Prophylaxe von Hornhautschäden versorgt. Im Anschluss daran wird das Tier mittels Klebestreifen an allen Extremitäten an der Unterlage fixiert. Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethanol wird das Retroperitoneum über einen etwa 1,5 cm lanken Flankenschnitt rechts eröffnet, die Niere dargestellt, am Nierenhilus mit einem resorbierbaren 2-0 Faden zweifach ligiert und schließlich entnommen. Bei Sham-operierten Mäusen wurde die Niere nach temporärer Umschlingung in situ belassen. Nach

Einbringen eines Antibiotikums (Neomycin) wurde das Retroperitoneum in fortlaufender Naht mit einem resorbierbaren Faden, die oberflächliche Hautschicht mit drei bis vier Wundklammern verschlossen. Zur Antagonisierung der Narkose werden der Maus in Abhängigkeit ihres Körpergewichts 170 bis 260 µl der Antagonistenmischung subkutan injiziert. Damit wird eine Dosis von 2,5 mg/kg Atipamezol, 0,5 mg/kg Flumazenil und 1,2 mg Naloxon erreicht. Nach Erwachen werden dem Tier zur postoperativen Analgesie ein bis zwei Tropfen Metamizol 1:200 peroral verabreicht.

Zur Verlaufskontrolle wurden monatlich Blutzuckermessungen durchgeführt. Nur Tiere mit einem Blutzuckerspiegel von mehr als 200 mg/dl wurden in die Studie eingeschlossen. Im Alter von 5 Monaten wurden die uninephrektomierten Mäuse (im Folgenden als „db/db 1K“ bezeichnet) in 3 Gruppen eingeteilt und erhielten dreimal pro Woche entweder das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG, das Kontroll-Spiegelmer PoC-PEG oder 5%-Glukoselösung subkutan in eine Rückenhautfalte injiziert. Die Sham-operierten Tiere (im Folgenden als „db/db 2K“ bezeichnet) erhielten ebenfalls 5%-Glukoselösung. Als weitere Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse, die nicht operiert wurden und keine Behandlung erhielten (Abbildung 18). Nach achtwöchiger Behandlung erfolgte die Organentnahme zur histopathologischen Analyse. Die Mäuse wurden dabei durch zervikale Dislokation getötet, anschließend die Nieren entnommen und für die RNA-Isolation vorbereitet oder in Paraffin zur histologischen Analyse fixiert. Am Tag der Organentnahme erfolgte die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus in Allgemeinanästhesie. Um Serum zu gewinnen, erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 3.000 Umdrehungen pro Minute für die Dauer von 5 Minuten. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Urinproben wurden monatlich gesammelt, um die Proteinurie zu bestimmen.

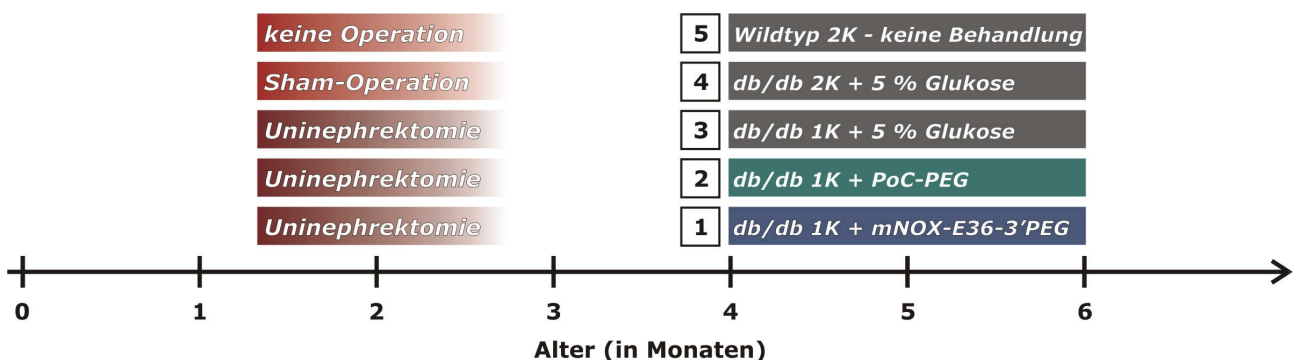


Abbildung 18: Studiendesign. Im Alter von 6 Wochen erfolgte die Uninephrektomie (1K) bzw. Sham-Operation (2K). Im Alter von 4 Monaten begann die 8-wöchige Behandlung, im Alter von 6 Monaten erfolgte die Organentnahme.

3.2.1.3.2 Mcp-1-Blockade beim Alport-Syndrom

Die Behandlung Kollagen-IV- α 3-defizienter Mäuse begann im Alter von 3 Wochen entweder mit mNOX-E36-3'PEG oder PoC-PEG bis zum Tod der Mäuse. In gleicher Weise wurden weitere Tiere behandelt, jedoch begann die Behandlung in diesem Fall erst im Alter von 6 Wochen. Einige dieser Tiere wurden bis zu deren Tod behandelt, andere bis zum Alter von 9 Wochen (63 Tage), ehe die Organentnahme erfolgte. Zur Kontrolle wurden gesunde Wildtyp-Tiere im Alter von 6 Wochen bis zur Organentnahme mit 9 Wochen mit 5%-Glukose behandelt (Abbildung 19).

Wöchentlich wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt und Urin zur Bestimmung der Proteinurie abgenommen. Blutproben wurden am Tag der Organentnahme nach Allgemeinanästhesie entnommen.

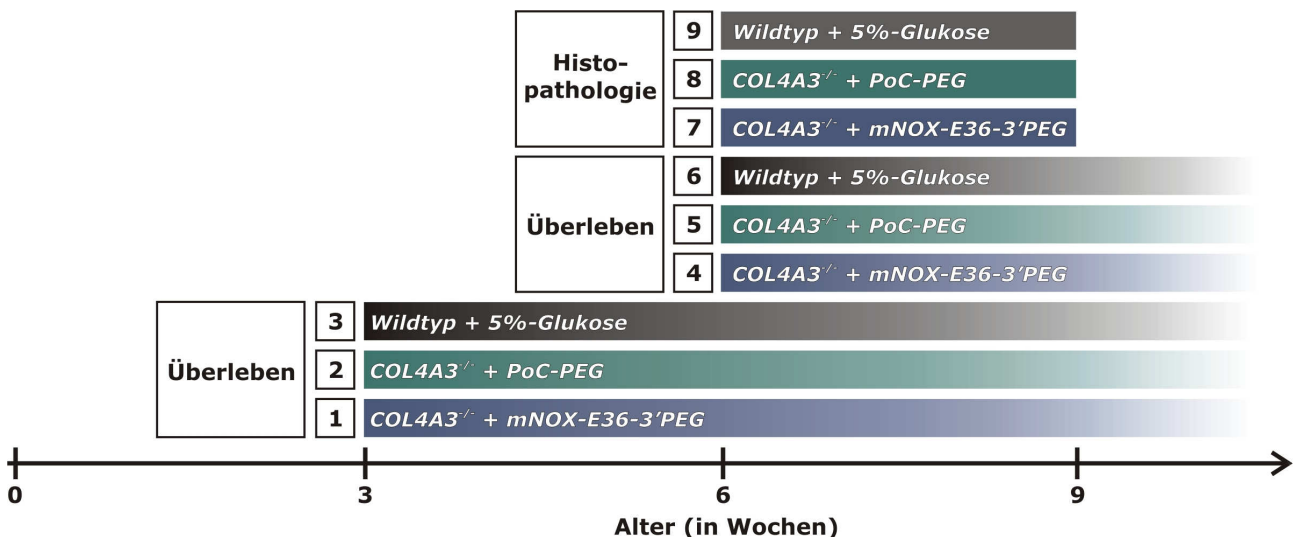


Abbildung 19: Studiendesign. COL4A3-defiziente und gesunde Wildtyp-Tiere wurden ab einem Alter von 3 Wochen (Gruppen 1/2/3) bzw. 6 Wochen (Gruppen 4/5/6) bis zum Eintreten des Todes behandelt (Kohorte „Überleben“). Daneben wurden COL4A3-defiziente und gesunde Wildtyp-Tiere ab einem Alter von 6 Wochen behandelt (Gruppen 7/8/9) bis im Alter von 9 Wochen die Organentnahme erfolgte (Kohorte „Histopathologie“).

3.2.1.4 Zelltransferstudie

3.2.1.4.1 Zellisolation

Mac2-positive Makrophagen wurden immunomagnetisch aus der Milz von db/db- bzw. COL4A3-defizienten Mäusen im Alter von 6 Monaten isoliert.

Db/db-Mäuse wurden im Alter von 6 Monaten, COL4A3^{-/-}-Mäuse im Alter von 8 Wochen mittels zervikaler Dislokation getötet und die Milzen zur Gewinnung von Makrophagen entnommen. Die Milzen wurden auf Eis in Petrischalen, die mit MACS-Puffer gefüllten waren, zerkleinert,

anschließend durch ein 30 µm Stahlsieb gepresst und in einer sterilen Petrischale gesammelt. Die entstehende Zellsuspension wurde bei 1.500 U/min und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit sterilem PBS gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert, zweimal gewaschen und anschließend zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension gefiltert. Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert. In der resultierenden Zellsuspension erfolgte eine Zellzählung.

Pro 10^7 Zellen wurde das Pellet in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert und 2 µl des FITC-markierten Mac2-Antikörpers zugegeben. Die Zellsuspension wurde gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal gewaschen und bei 300g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, pro 10^7 Zellen wurde das Pellet in 90 µl MACS-Puffer resuspendiert und 10 µl MACS Anti-FITC Microbeads zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei 6-12 °C wurden die Zellen durch Zugabe von MACS-Puffer gewaschen und bei 300g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet pro 10^8 Zellen in 500 µl resuspendiert. Die resultierende Zellsuspension wurde in LS⁺/VS⁺-positive Selektionssäulen gegeben, die mit 3 ml MACS-Puffer umspült wurden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde durchflusszytometrisch verifiziert.

3.2.1.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Isolierte Mac2-positive Makrophagen wurden entsprechend den Herstellerangaben mit PKH26 markiert, einem roten Fluoreszenzfarbstoff.

Alle Schritte wurden bei 25 °C durchgeführt. Eine Zellsuspension (2×10^7 Zellen pro Probe) wurde mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen und 5 Minuten bei 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Diluent C resuspendiert. Dazu wurde 1 ml frisch zubereitetes 4×10^{-6} M PKH26 zugegeben und bei gelegentlichem vorsichtigem Mischen 3 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml FCS mit anschließender einminütiger Inkubation beendet. Die Lösung wurde durch Zugabe von 3 ml Medium, bestehend aus RPMI und 10 % FCS, verdünnt und 10 Minuten bei 400g zentrifugiert, um die Zellen aus der Färbelösung zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet dreimal durch Zugabe von 10 ml des Mediums aus RPMI und 10 % FCS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in RPMI/FCS-Medium resuspendiert. Eine Zellzahlbestimmung wurde durchgeführt und die Effektivität der Fluoreszenzmarkierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.2.1.4.3 i.v.-Injektionsprotokoll

$3,5 \times 10^5$ Mac2-Makrophagen wurden in einem Volumen von 200 μ l isotonischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene von 6 Monate alten db/db-Mäusen und 8 Wochen alten COL4A3^{-/-}-Mäusen injiziert. Die Mäuse erhielten jeweils 3 Stunden zuvor eine Einzaldosis mNOX-E36-3'PEG, PoC-PEG bzw. 5%-Glukoselösung. Drei Stunden nach der Injektion der Makrophagensuspension erfolgte die Organentnahme. Die Nieren wurden in *Tissue freezing medium* schockgefroren und für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Die Anzahl fluoreszenzmarkierter interstitieller Zellen wurde in 15 Gesichtsfeldern (*high power fields, hpf*) bestimmt.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Zelllinien und Kulturbedingungen

Die Makrophagen-Zelllinie der Maus J774 wurde in einem Zellkulturvollmedium kultiviert, bestehend aus RPMI 1640, 10 % Hitze-inaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin sowie 100 μ g/ml Streptomycin. Die Kultivierung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem Brutschrank bei 37 °C und einem 5% CO₂/Luft-Gemisch.

Eine Mesangialzelllinie der Maus wurde kultiviert in einem Medium aus DMEM, 5 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin unter standardisierten Bedingungen wie bereits oben beschrieben.

Sowohl die J774-Makrophagen als auch die Mesangialzellen der Maus verdoppeln sich alle 24-36 Stunden und wurden zweimal pro Woche geteilt: nach Entfernung des alten Mediums wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine EDTA-Trypsin-Lösung zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 5 Minuten bebrütet. Diese „Trypsinierung“ wurde durch Zugabe von Zellkulturvollmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde abschließend in ein neues Falcon-Gefäß gegeben, bei Raumtemperatur für 3 Minuten bei 1.000 RPM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml RPMI- oder DMEM-Medium resuspendiert.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die gewünschte Zahl an Zellen in 6-well-Platten aufgebracht und für 24 Stunden bei 37 °C unter standardisierten Bedingungen bebrütet.

3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen für 3 Minuten bei 1.000 RPM zentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis vorsichtig in einem Einfriermedium, bestehend aus 90 % FCS und 10 % DMSO, durch wiederholtes Ansaugen und Abwerfen mittels der Pipette resuspendiert. Teilproben (aliquots) mit einem Volumen von 1,5 ml wurden rasch in entsprechende bereits auf

4 °C vorgekühlte Einfrier-Gefäße übertragen und langsam gekühlt: zuerst wurden die Zellen für 1 Stunde bei -20 °C aufbewahrt, über Nacht bei -80°C bis sie am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gebracht wurden.

Um die Zellen erneut aufzutauen wurde ein Gefäß aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml warmem Zellkulturvollmedium gelöst und bei 1000 RPM für 5 bis 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Das Medium wurde 24 Stunden danach erneut gewechselt.

3.2.2.3 Stimulationsexperiment

Jeweils 5×10^5 Zellen/ml wurden 24 Stunden vor der Stimulation in einem Medium aus RPMI (J774 Makrophagen) oder DMEM (Mesangialzellen), zum einen mit und zum anderen ohne FCS gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit 10 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml oder 200 µg/ml Spiegelmer bebrütet.

Mittels „CellTiter 96 Proliferation Assay“ wurde die Proliferation der Zellen nach 72 Stunden ermittelt. Dazu wurden zu jeweils 5×10^5 Zellen/ml 20 µl CellTiter 96 Aqueous One Lösung gegeben und für 90 Minuten bei 37 °C gehalten. Die optische Dichte wurde bei 492 nm bestimmt.

3.2.3 Immunhistochemische Methoden und histopathologische Analyse

Teile der entnommenen Nieren wurden in Histosettes gegeben, in einer Lösung aus PBS und 10% Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von diesen eingebetteten Blöcken wurden jeweils 2 µm dicke Schnitte angefertigt und im Anschluss daran mittels absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Die Schnitte wurden dabei jeweils 3 Minuten in Xylol, 100 % Ethanol, 95 % Ethanol, 80 % Ethanol, 50 % Ethanol sowie PBS inkubiert. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Antikörper verwendet: Ratte anti-Mac2 (glomeruläre Makrophagen), Ratte anti-F4/80 (interstitielle Makrophagen), Ratte anti-Ki-67 (proliferierende Zellen), Ratte anti-CD3 (Lymphozyten), Ratte anti-MECA-32 (Endothelzellen), Schaf anti-Ccl2. Als Sekundärantikörper wurden jeweils anti-Ratte-IgG bzw. anti-Schaf-IgG verwendet. Die Negativkontrollen wurden mit dem jeweiligen Isotyp-Antikörper inkubiert.

Zur quantitativen Analyse wurden 2 µm dicke Schnitte mit Perjodsaurer Schiffreagenz bzw. Silber entsprechend den Herstellerangaben gefärbt. Das Ausmaß der Glomerulosklerose wurde semiquantitativ durch einen verblindeten Untersucher bestimmt. Dabei erhielten pro Niere 15 Glomeruli einen Punktwert. Der Punktwert 0 repräsentierte ein gesundes Glomerulus ohne Sklerose, der Punktwert 1 ein Glomerulus, das maximal zu 25 % sklerotisch verändert war, der

Punktwert 2 ein Glomerulus, das maximal 50 % sklerotisch war, der Punktwert 3 ein Glomerulus, das maximal 75 % sklerotisch war und der Punktwert 4 stand für ein völlig sklerotisches Glomerulus (Abbildung 20).

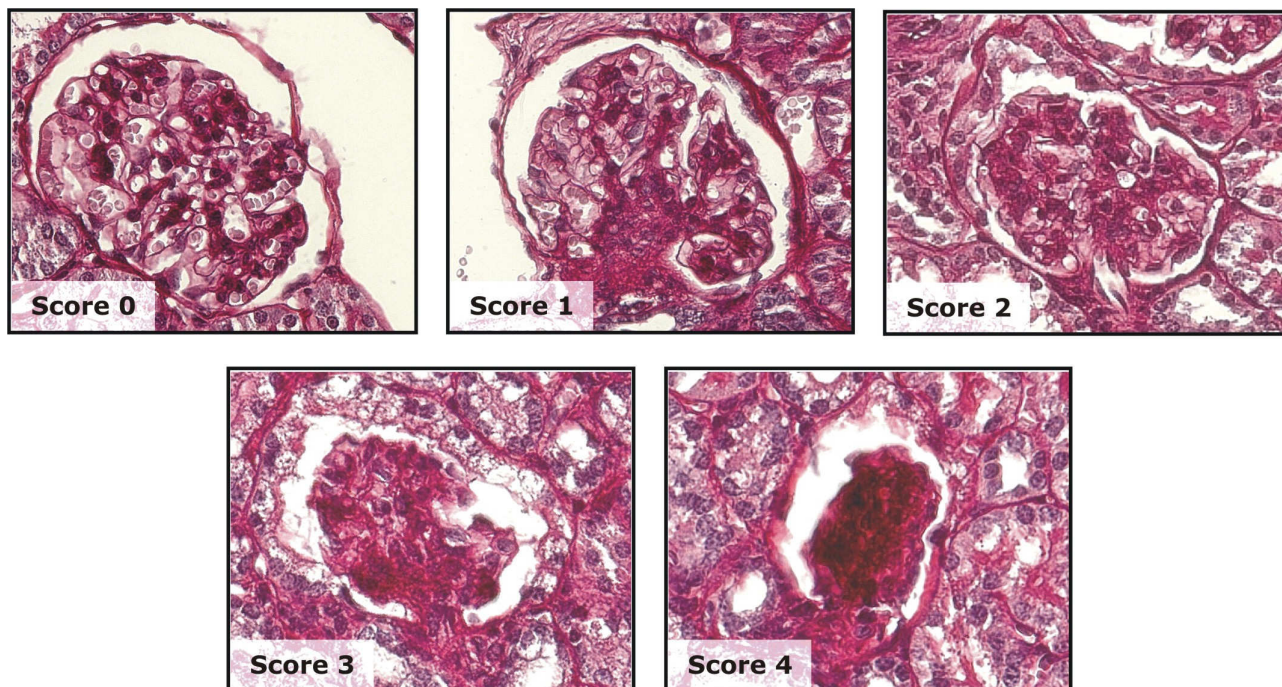


Abbildung 20: Quantitative Analyse der Glomerulosklerose. Repräsentative histologische Schnitte, gefärbt mit PAS (engl. *periodic acid schiff stain*). Jeweils 15 Glomeruli pro Tier wurden entsprechend der Schädigung ein Punktwert zugeordnet: Punktwert 0 bei gesundem Glomerulus, Punktwert 1 bei maximal 25 % Schädigung, Punktwert 2 bei 25%-50% Schädigung, Punktwert 3 bei 50%-75% Schädigung und Punktwert 4 bei völlig sklerotischem Glomerulus. Vergrößerung 400x.

Die Indizes für Tubuluszellschädigung, Tubulusdilatation, interstitielle Volumenzunahme und interstitielle Kollagenablagerung wurden anhand der Silberfärbung bestimmt, indem durch einen verblindeten Untersucher pro Niere jeweils 100 standardisierte Punkte von 10 nicht überlappenden kortikalen Fotos in einer Vergrößerung von 20x ausgezählt wurden.

Interstitielle Zellzahlen wurden in jeweils 15 Gesichtsfelder (*high power fields*, hpf, 400x) durch einen verblindeten Untersucher ausgezählt.

3.2.4 ELISA

3.2.4.1 Allgemeines

Unter *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* versteht man ein auf einer enzymatischen Farbreaktion beruhendes immunologisches Nachweisverfahren [50, 51]. Zum Einsatz kommen hierbei Antikörper, die spezifisch an ihr Antigen, d.h. an die nachzuweisende Substanz, binden.

Die messbare und damit für das Vorliegen der nachzuweisenden Substanz beweisende Farbreaktion wird durch ein zuvor an den Antikörper gekoppeltes Enzym katalysiert.

Beim sog. „Sandwich-ELISA“ handelt es sich um eine modifizierte Technik des ELISA, bei der zwei Antikörper verwendet werden, die an jeweils unterschiedlichen Stellen der nachzuweisenden Substanz binden. Der erste („*coating*-“) Antikörper wird auf eine 96-well-Microtiterplatte aufgetragen und bindet dort an die Oberfläche. Nun wird die Probe zugegeben und der erste Antikörper kann die nachzuweisende Substanz in der Probe proportional zu ihrer Konzentration binden. Im nächsten Schritt wird der zweite („*detection*-“) Antikörper zugegeben. Dieser ist mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), gekoppelt und bindet nun ebenfalls an die nachzuweisende Substanz, allerdings an ein anderes Epitop, wodurch ein Komplex aus ersten Antikörper, nachzuweisender Substanz und zweitem Antikörper entsteht, der bildlich an ein Sandwich erinnert. Ein anschließend zugegebenes Chromogen kann nun von dem gekoppelten Enzym gespalten werden, wodurch ein photometrisch messbarer Farbumschlag entsteht. Die gemessene Absorption ist dabei proportional zur Konzentration des entstandenen Farbstoffs und aufgrund der Kopplung des Enzyms an den zweiten Antikörper auch proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Substanz.

Durch Auftragen der nachzuweisenden Substanz in verschiedenen exakt definierten Konzentrationen kann eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die gemessene Absorption der Probe in eine Konzentration umgerechnet werden kann.

3.2.4.2 Bestimmung der Albuminurie

Die Konzentration des Albumins im Urin wurde mittels ELISA bestimmt. Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit Antikörpern der Ziege gegen Mausalbumin beschickt und bei 4 °C 12 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Platte geblockt, d.h. ein Puffer, der BSA (*bovine serum albumin*) enthält, wird zugegeben, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen wurden jeweils 100 µl der Proben und eine zuvor hergestellte Standardreihe aufgetragen und erneut bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und ein Antikörper zugegeben, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Nach einstündiger Inkubation und fünfmaligem Waschen wurde ein Gemisch aus TMB zugegeben, das von der Meerrettichperoxidase enzymatisch gespalten wurde, was zu einem sichtbar blauem Farbumschlag führte. Sobald ein derartiger Farbumschlag sichtbar wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen. Mittels eines Microplatereaders wurde anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen, aus den Werten der Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt, die schließlich eine Berechnung der Albuminkonzentration in den Proben ermöglichte.

3.2.4.3 Bestimmung der Mcp-1-Konzentration

Mittels ELISA wurde sowohl im Urin als auch im Serum die Konzentration von Mcp-1 bestimmt. Eine 96-well-Mikrotiterplatte wird mit Antikörpern gegen Mcp-1 der Maus inkubiert, unspezifische Reaktionen werden durch Zugabe eines Puffers blockiert, die entsprechenden Urin- bzw. Serumproben sowie die Standardreihe werden aufgetragen, der mit Meerrettichperoxidase gekoppelte zweite Antikörper wird zugegeben, das hinzugefügte Gemisch aus TMB wird als Substrat der Meerrettichperoxidase enzymatisch gespalten, woraufhin die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure beendet wird. Ähnlich der Bestimmung der Albuminurie, müssen auch bei diesem ELISA genaue Inkubationszeiten eingehalten werden, bevor überschüssige Substanzen ausgewaschen werden können. Abschließend wird mittels Microplatereader die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Absorption der einzelnen Proben unter Bezugnahme auf die erstellte Standardkurve berechnet.

3.2.5 Kreatininbestimmung

Die Bestimmung des Kreatinins im Urin beruht auf der sog. Jaffé-Methode. Dieser Methode liegt die chemische Eigenschaft von Kreatinin zugrunde, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orangeroten Farbkomplex zu bilden, dessen Extinktionsdifferenz proportional zur Kreatininkonzentration ist. Zu Beginn der bei Raumtemperatur durchgeführten Bestimmung wird in einer 1-cm-Küvette 1 µl Urin mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt und anschließend durch Zugabe von 1000 µl Natronlauge (0,16 mol/l) alkalisiert. Nach einer kurzen Inkubationszeit von etwa einer Minute werden 250 µl Pikrinsäure (4,0 mmol/l) zugegeben und mit der Probe vermischt. Die Extinktion wird nach einer sowie nach drei Minuten im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Neben den eigentlichen Urinproben werden jeweils auch ein Leerwert sowie ein Standardwert mit der Kreatininkonzentration von 2 mg/dl gemessen. Zur Berechnung der Kreatininkonzentration wird die Differenz der bei 60 und 180 Sekunden gemessenen Extinktion berechnet. Die Extinktionsdifferenz eines Leerwertes wird anschließend von der Extinktionsdifferenz der Probe und des Standardwerts subtrahiert. Die Kreatininkonzentration stellt nun den mit der Kreatininkonzentration des Standards und der Verdünnung der Probe multiplizierten Quotienten aus den Extinktionsdifferenzen der Probe und des Standardwertes dar.

$$c_{\text{(Kreatinin)}} \text{ (mg/dl)} = \frac{(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}}{(E_2 - E_1)_{\text{Standard}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}} \times c_{\text{(Kreatinin-Standard)}} \times 50$$

3.2.6 Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wurde mittels Inulin-Clearance bestimmt [176]. Das mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (*fluorescein isothiocyanate*) gekoppelte Inulin wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst (50 mg Inulin pro 1 ml NaCl 0,9 %) und anschließend eine Stunde bei 60 °C erwärmt. Da die FITC-Fluoreszenz durch Schwankungen des pH-Werts stark beeinflusst werden kann, wurde zu der durch Filtrierung sterilisierten Lösung 500 mM HEPES gegeben, um den pH-Wert bei 7,4 zu stabilisieren.

Von der gebrauchsfertigen Lösung wurden den Mäusen in Allgemeinnarkose 3 µl pro Gramm Körpergewicht in den retroorbitalen Venenplexus injiziert. Nach jeweils 5, 10, 15, 20, 35, 60 und 90 Minuten erfolgten die Blutabnahmen aus dem retroorbitalen Venenplexus. Aus dem so gewonnenen Blut wurde mittels Zentrifugation Serum gewonnen. Um aus der FITC-Fluoreszenz die Inulin-Konzentration berechnen zu können, wurde durch stufenweise Verdünnung von Inulin eine Standardreihe hergestellt, die zusammen mit den Serumproben auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen wurde. In einem Microplatereader wurde das FITC anschließend bei 485 nm angeregt (Exzitation) und die Emission bei 538 nm gemessen. Die gemessene Emission ist dabei direkt proportional zur Inulinkonzentration.

Bei der Berechnung der GFR legt man ein Zwei-Kompartiment-Modell zugrunde. Man geht davon aus, dass der injizierte FITC-Inulin-Bolus zuerst im intra- und extrazellulären Kompartiment verteilt wird (Verteilungsphase; repräsentiert durch einen raschen Abfall der Fluoreszenz im Plasma) und anschließend langsam aus dem Plasma entfernt wird (Eliminationsphase; repräsentiert durch einen langsamen Abfall der Fluoreszenz im Plasma). Damit entspricht die Eliminationsphase der Inulin-Clearance. Die gemessene optische Dichte wurde mittels geeigneter Software durch nicht-lineare Regression in eine zweiphasige Abklingkurve eingepasst und so die GFR berechnet.

3.2.7 RNA-Analyse

3.2.7.1 Isolierung von RNA

Von jeder Maus wurden Teile der Niere bei der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur RNA Isolation wurde eine modifizierte Chomczynski-Methode verwendet. 3 ml der Lösung D, die 8 µl β-Mercaptoethanol pro ml enthielt, wurde zusammen mit einem kleinen Gewebestück in ein 15 ml Falcon gegeben. Das Gewebe wurde mittels ULTRA-TURRAX T25, Geschwindigkeitsstufe 2, homogenisiert und auf Eis gelagert. Es wurden 300 µl 2M Natriumacetatlösung zugegeben und vorsichtig gemischt, ehe 3 ml Roti-Aqua-Phenol zugegeben wurden. Nach vorsichtigem Mischen wurden 1,6 ml einer im Verhältnis 49:1 zubereiteten Lösung aus Chloroform und Isoamylalkohol zugegeben. Die entstehende Lösung wurde 20 Sekunden gemischt bis eine milchig-weiße Suspension

resultierte. Die Suspension wurde für 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C und 4.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase (etwa 3 ml) wurde zusammen mit 3 ml Isopropanol in ein neues Falcon gegeben, 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 4 °C und 4.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Papier gegeben um das verbleibende Isopropanol und die 1 ml Lösung ablaufen zu lassen. Das Pellet wurde in 0,5 ml Lösung D gelöst, die Lösung anschließend zusammen mit 0,8 ml Isopropanol in frische DEPC-behandelte Gefäße gegeben, gemischt, für 30 Minuten bei -20 °C gelagert und anschließend 15 Minuten bei 4 °C und 4.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80 % Ethanol in DEPC Wasser (Diethyl Pyrocarbonat) gewaschen, 15 Minuten gemischt und schließlich erneut bei 4 °C und 4.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet auf Papier gebracht um das restliche Ethanol zu entfernen. Das halb getrocknete Pellet wurde in 100 µl DEPC Wasser gelöst. Eine 10 µl-Teilprobe wurde zur Qualitätskontrolle verwendet, die restliche RNA-Lösung wurde bis zur Gewinnung der cDNA bei -80 °C gelagert. Die RNA wurde quantifiziert und ihre Qualität bestimmt: 2 µl der RNA-Lösung wurde 50-fach in DEPC Wasser verdünnt und das Verhältnis der optischen Dichte 260/280 nm photometrisch bestimmt. Um das gewünschte RNA-Volumen pro Probe (µl/ml) zu erhalten wurde die Extinktion mit der Verdünnung multipliziert. Ein Extinktionsverhältnis von 1,6 wurde als akzeptable Qualität angenommen.

3.2.7.2 Synthese der cDNA

Die isolierten RNA-Proben wurden in DEPC Wasser bis zu einer Konzentration von 1 µg/20 µl verdünnt. Ein Mastermix wurde vorbereitet. Dieser beinhaltete 9 µl 5x Puffer, 1 µl 25 mM dNTP-Mischung, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 40U/µl RNasin, 0,5 µl Hexanucleotide, 1 µl Superscript oder ddH₂O zur Kontrolle. 15 µl des Mastermix wurden zusammen mit 1 µg/20 µl RNA-Probe in DEPC-behandelte Eppendorf-Röhrchen gegeben, gemischt und bei 42 °C eine Stunde unter permanenter Durchmischung im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die cDNA-Proben bei -20 °C bis zur real-time RT-PCR-Analyse gelagert.

3.2.7.3 Real-time RT-PCR

Die cDNA-Proben wurden im Verhältnis 1:10 in TE-Puffer, bestehend aus 10 mM TRIS-HCl und 0,1 mM EDTA verdünnt. Die real-time RT-PCR wurde mit einem TaqMan® ABI prism 7700 durchgeführt. Die quantitative PCR für mRNA basiert auf der Anlagerung sequenz-spezifischer Primer und Sonden. Letztere besitzen am 3'-Ende einen sog. „*Quencher*“, am 5'-Ende einen „*Reporter*“. Die Sonde absorbiert am 3'-Ende TAMRA und am 5'-Ende das andere fluoreszierende Material, wie etwa FAM oder VIC. Der TaqMan® universal PCR master mix beinhaltet eine Taq-Polymerase mit 5'→3'-Polymeraseaktivität und 5'→3'-Exonucleaseaktivität.

Während der Elongationsphase werden spezifisch gebundene Sonden durch die Exonucleaseaktivität hydrolysiert und damit freigesetzt. Mit jedem neu synthetisierten DNA-Strang wird fluoreszierendes Material frei gesetzt und die resultierende Fluoreszenz bei 488 nm gemessen. Das resultierende Fluoreszenzsignal ist dabei direkt proportional zur synthetisierten DNA-Menge. Für jede Probe wurde der „CT-Wert“ (*cycle threshold*) errechnet. Es handelt sich dabei um die Anzahl an Zyklen, nach der das Fluoreszenzsignal einen vorher festgelegten Grenzwert überschreitet.

Der TaqMan® universal PCR master mix enthielt die PCR-Puffer, dNTPs und die AmpliTaqGold® (Taq-Polymerase ohne 3'→5' Exonucleaseaktivität). Der jeweilige Primermix enthielt die forward primer und die reverse primer in einer Endkonzentration von 300 nM sowie die Sonde in einer Endkonzentration von 100 nM. Jeweils 10 µl dieses Mastermix wurden zusammen mit 2 µl Proben, 7 µl H₂O und 7 µl des jeweiligen Primers in jedes der 96 wells einer Microtiterplatte pipettiert. Die Platte wurde anschließend verplombt, bei 280 x g zentrifugiert und mittels TaqMan® ABI prism 7700 analysiert. Für die TaqMan® RT-PCR wurden folgende Temperatureinstellungen verwendet: die erste Inkubation erfolgte für 2 Minuten bei 50 °C und anschließend entsprechend der Aktivität der Taq-Polymerase 10 Minuten bei 95 °C. Die Proben wurden während 40 Zyklen, die jeweils 15 Sekunden 95 °C und anschließend 1 Minute 60 °C beinhalteten, vervielfältigt. Die RT-PCR für den Housekeeper (18S rRNA oder GAPDH) wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt, statt der Primer wurde jedoch 18S rRNA oder GAPDH verwendet. Die CT-Werte wurden durch Verwendung der ABI PRISM Sequence Detection software (Version 1.0) aufgezeichnet und die Ergebnisse wurden entsprechend im Verhältnis zum Housekeeper-Gen berechnet. In allen Fällen waren die Ergebnisse der Kontrollen aus ddH₂O negativ, sowohl für die Proben als auch für den Housekeeper. Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer (300 nM) und Sonden (100 nM) werden in Abschnitt 3.1.5. beschrieben.

3.2.8 Laser-Mikrodissektion

3.2.8.1 Grundlagen der Laser-Mikrodissektion

Die Niere besteht aus zwei spezifischen Kompartimenten, dem Glomerulus und dem Tubulointerstitium. Beide Kompartimente können bei Nierenerkrankungen jeweils unterschiedlich betroffen sein. Um die Auswirkungen einer Erkrankung speziell auf das glomeruläre Kompartiment zu untersuchen, müssen Glomeruli daher isoliert und getrennt vom Tubulointerstitium untersucht werden. Zur Isolation von Gewebe stehen verschiedene Separationstechniken wie etwa FACS oder Beads zur Verfügung. Diese Techniken können jedoch nur mit Zellsuspensionen durchgeführt werden, eignen sich daher nicht, um gezielt Glomeruli in toto zu isolieren. Aus diesem Grund wurden Mikrodissektionsverfahren entwickelt,

die es ermöglichen, Zellen oder zusammenhängende Gewebe aus formaldehyd-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten unter direkter visueller Kontrolle zu isolieren.

Da die bereits früh entwickelte Methode der manuellen Mikrodissektion langwierig, stark vom Geschick des Benutzers abhängig und zum Teil dennoch unspezifisch ist, wurden so genannte „no-touch“ Techniken entwickelt, die *laser capture microdissection* (LCM) [49] und die *laser microbeam microdissection* (LMM) [18, 196]. Bei der 1996 im *National Cancer Institute* entwickelten Methode der LCM [49] wird ein Polymerfilm auf dem Gewebeschnitt angebracht, das gewünschte Gewebe wird unter mikroskopischer Kontrolle ausgewählt und mit einem fokussierten Infrarot-Laserstrahl umfahren. Die Energie des Laserstrahls wird dabei in einem bestimmten Punkt des Polymerfilms absorbiert und der Film schmilzt an dieser Stelle. Das lokal geschmolzene Polymer expandiert, füllt die Zwischenräume des darunterliegenden Gewebes aus, verfestigt sich beim Abkühlen und fusioniert damit mit dem gewünschten Gewebe, das nun bei völlig erhaltener Morphologie zusammen mit dem Polymerfilm aus dem umgebenden Gewebe entfernt werden kann [14, 19, 202] (Abbildung 21). Bei der *Laser microbeam microdissection* (LMM) wird statt eines Hitze-erzeugenden Infrarotlasers ein UV-Laser verwendet, der durch kalte Photolyse (im Gegensatz zur thermischen Mikrodissektion der LCM) die Mikrodissektion des Gewebes und überdies auch die Entnahme des gewünschten Gewebes durch *laser pressure catapulting* bewirkt. Das gewünschte Gewebe wird dabei nach der Umfahrung mit dem Laser durch einen einzelnen hochenergetischen Laserstrahl aus dem Gewebe auf ein Glasplättchen oder in den Deckel eines Eppendorf-Röhrchens herauskatapultiert.

In der vorliegenden Studie wurde die *Laser microbeam microdissection* entsprechend einem von Cohen, et al. etablierten Protokoll durch Herrn PD Dr. med. H. Schmid am DKFZ in Heidelberg durchgeführt [33].

3.2.8.2 Vorbereitung

Auf einem Glasobjektträger wird ein 1,35 µm dicker Polyethylenfilm mittels Cyanacrylatkleber fixiert und mit 0,1 % Poly-L-Lysin beschickt. Aus Nierengewebe, das in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurde, werden mittels Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einem Objektträger platziert. Das Nierengewebe wird, indem es zweimal für je 10 Minuten in Xylol gegeben wird, deparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100 % Ethanol – 90 % Ethanol – 70 % Ethanol) rehydriert. Die Schnitte werden kurz, d.h. 10 Sekunden, in Hämalaun gefärbt, anschließend mittels umgekehrter Alkoholreihe hydriert und 2 Minuten an der Luft getrocknet.

3.2.8.3 Durchführung

Aus den so aufbereiteten Schnitten wurden an einem Robot MicroBeam System etwa 100 Glomeruli pro Tier unter direkter visueller Kontrolle durch Verwendung eines fokussierten Stickstofflasers mit einer Wellenlänge von 337 nm aus dem umgebenden Gewebe ausgeschnitten. Anschließend wurden die gewünschten Glomeruli mit Hilfe eines energiereicheren Laserimpulses aus dem Gewebe in den mit mineralischem Öl beschichteten Deckel eines Eppendorf-Röhrchens herauskatapultiert. Der Deckel mit den gesammelten Glomeruli wird auf das entsprechende 200 µl Lysepuffer enthaltende Eppendorf-Röhrchen gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Mit den isolierten Glomeruli wurde eine Real-time RT-PCR (siehe 3.2.7.3) durchgeführt.

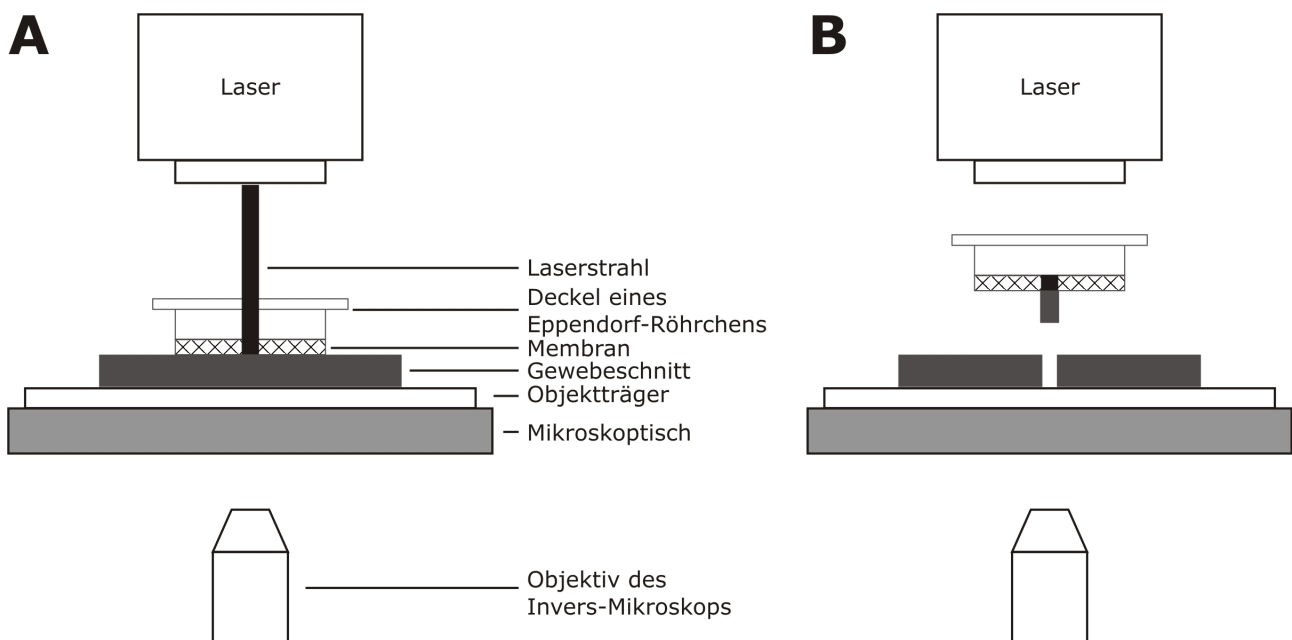


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Laser capture microdissection (LCM), nach [58]. Zur einfacheren Entnahme des Gewebes nach der Mikrodissektion ist die Transfermembran direkt an der Unterseite eines Eppendorf-Röhrchens angebracht. **A** Unter direkter visueller Kontrolle wird das gewünschte Gewebe mit einem fokussierten Laserstrahl umfahren. Die Energie des Laserstrahls wird von einer Membran absorbiert, die daraufhin schmilzt und mit dem darunterliegenden Gewebe fusioniert. **B** Das gewünschte Gewebe kann bei völlig erhaltener Morphologie entnommen und weiterverarbeitet werden.

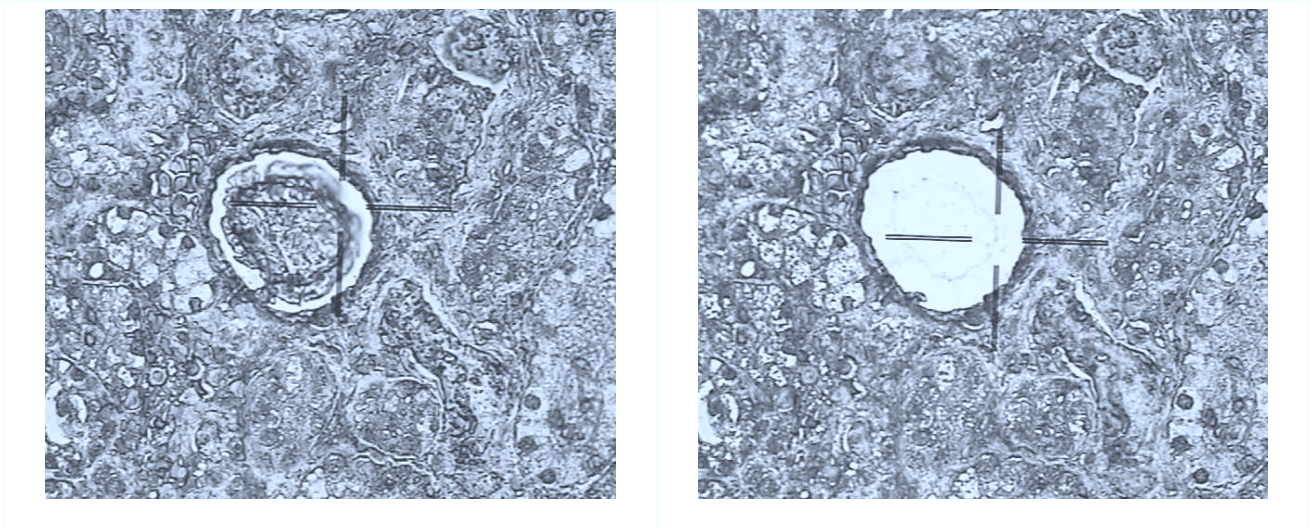


Abbildung 22: Bei der Laser capture microdissection werden pro Maus 100 Glomeruli unter direkter visueller Kontrolle mittels eines fokussierten Stickstofflasers ausgeschnitten und anschließend durch einen energiereicheren Laserimpuls aus dem Gewebe herauskatapultiert. Vergrößerung 200x.

3.2.9 Statistische Auswertung

Die angegebenen Werte entsprechen den jeweiligen Mittelwerten. Als Fehlerkorrektur wird der SEM (*Standard error of the mean*) als Quotient der Standardabweichung und der Quadratwurzel aus der Anzahl angegeben. Die Varianzanalyse wurde mittels zweiseitigem gepaartem *student t-Test* als univariates sowie ANOVA (*analysis of variance*) mit anschließender Bonferroni-Korrektur als multivariates Verfahren durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert von unter 0,05 angenommen. Die Überlebenskurven wurden verglichen durch *log-rank two-tailed testing*, anhand von Kaplan-Meier-Analysen erstellt. Die Berechnungen wurden mittels GraphPad Prism 5.0 durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Effekt der Mcp-1-Blockade bei db/db-Mäusen

4.1.1 Rekrutierung von Makrophagen in die Niere

Um die Blockade der Makrophagenrekrutierung in die Niere durch das Spiegelmer zu verifizieren, wurde eine Zelltransferstudie durchgeführt. Dabei wurden *ex vivo* fluoreszenzmarkierte Mac2-positive Monozyten in uninephrektomierte Mäuse im Alter von fünf Monaten intravenös injiziert. Die Mäuse erhielten vorab eine Einzeldosis mNOX-E36-3'PEG, PoC-PEG oder das Vehikel (5%-Glukose). Drei Stunden nach Injektion konnte eine Einwanderung von Mac2-positiven Monozyten sowohl in das glomeruläre als auch in das interstitielle Kompartiment der uninephrektomierten Mäuse nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung mit mNOX-E36-3'PEG verringerte dabei signifikant die Einwanderung von Mac2-positiven Zellen in Glomeruli und Tubulointerstitium bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen (Abbildung 23). Diese Ergebnisse konnten die Wirkung von mNOX-E36-3'PEG *in vivo* bestätigen und lieferten die Rationale für die Verwendung des Spiegelmers zur Blockade der Makrophagenrekrutierung in uninephrektomierten db/db-Mäusen, einem Modell der fortgeschrittenen diabetischen Nephropathie.

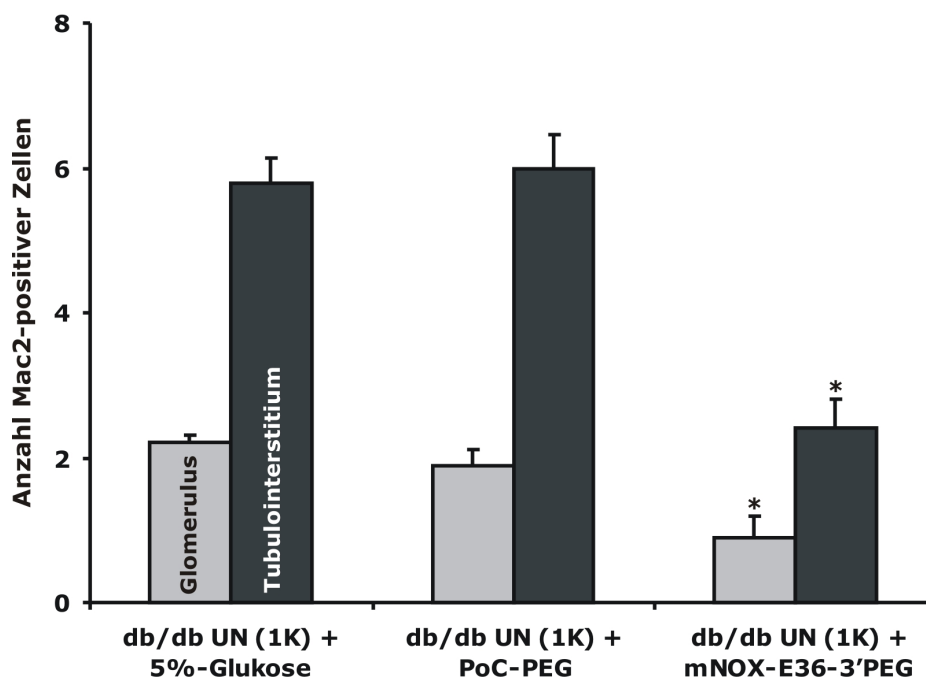


Abbildung 23: mNOX-E36-3'PEG blockiert die Rekrutierung von Monozyten in die Niere. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl Mac2-positiver Zellen im tubulointerstitiellen, die grauen Balken im glomerulären Kompartiment der Niere. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten \pm SEM. Ausgezählt wurden jeweils 10 Glomeruli bzw. 15 *high power fields* (hpf) pro Tier. * $p < 0,001$ mNOX-E36-3'PEG vs. 5%-Glukose/PoC-PEG.

4.1.2 Körpergewicht und Blutzuckerspiegel

Nachdem die Effektivität des Spiegelmers nachgewiesen worden war, begann die Behandlung der Versuchstiere, denen im Alter von fünf Monaten für die Dauer von acht Wochen dreimal wöchentlich mNOX-E36-3'PEG, PoC-PEG oder 5%-Glukose subkutan injiziert wurde.

Körpergewicht und Blutzucker wurden monatlich im Alter von jeweils 8, 12, 16, 20 und 24 Wochen bestimmt. Das Körpergewicht ist bei den diabetischen Tieren, verglichen mit den nicht-diabetischen Tieren, signifikant erhöht. Die diabetischen Tiere zeigen hinsichtlich des Körpergewichts ein relativ homogenes Bild, lediglich die mit 5%-Glukose behandelten Tiere unterscheiden sich im Alter von 20 und 24 Wochen signifikant von den anderen diabetischen Tieren. Weitere Unterschiede und damit ein Einfluss des Spiegelmers auf das Körpergewicht konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 24).

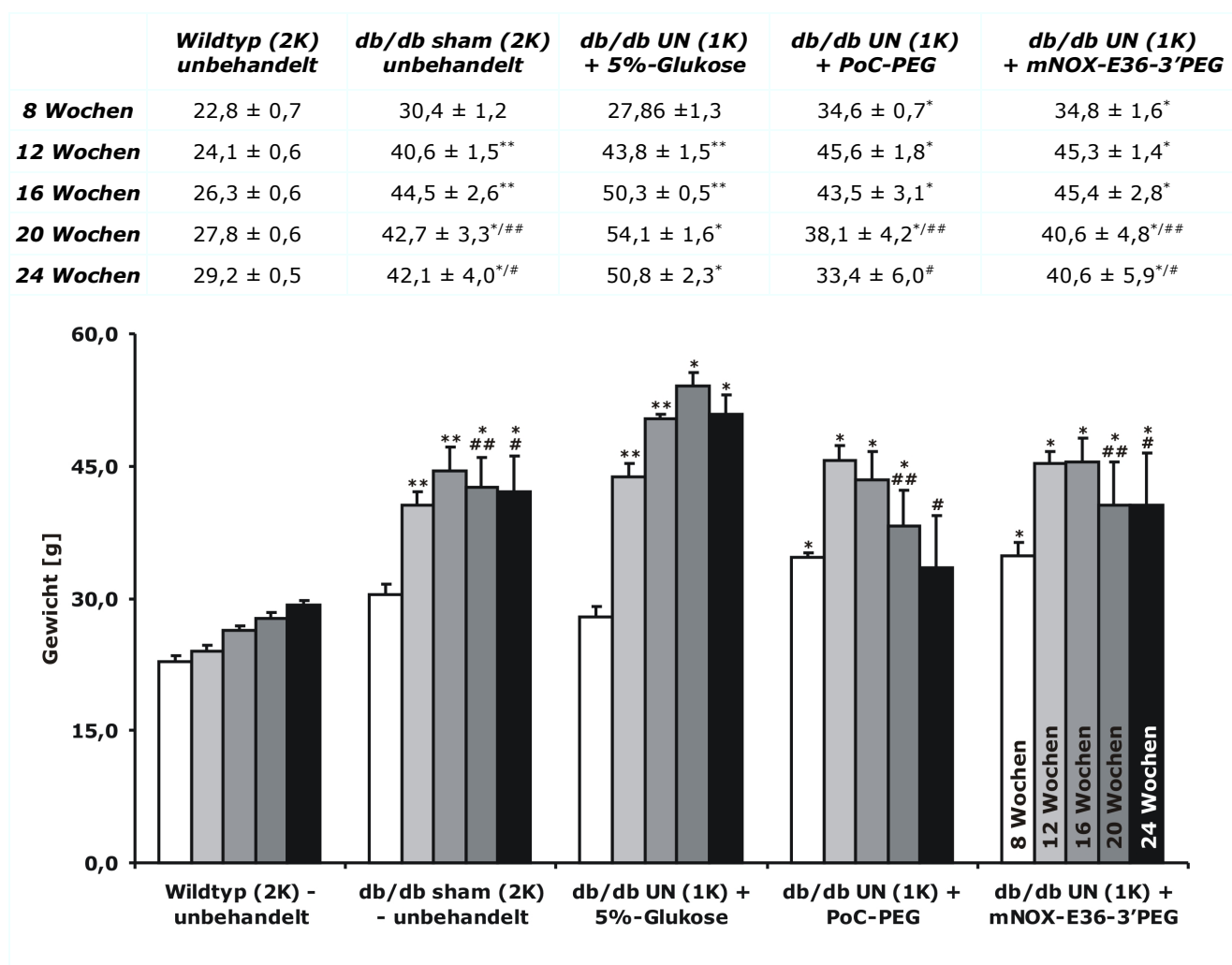


Abbildung 24: Körpergewicht. * p < 0,05 vs. Wildtyp; ** p < 0,001 vs. Wildtyp; # p < 0,05 vs. 5%-Glukose; ## p < 0,001 vs. 5%-Glukose

Die diabetischen Tiere weisen im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren ab einem Alter von 16 Wochen signifikant erhöhte Blutzuckerwerte auf. Die diabetischen Tiere untereinander unterscheiden sich hinsichtlich des Blutzuckerspiegels nicht. Weder die Uninephrektomie noch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG zeigen signifikanten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel (Abbildung 25).

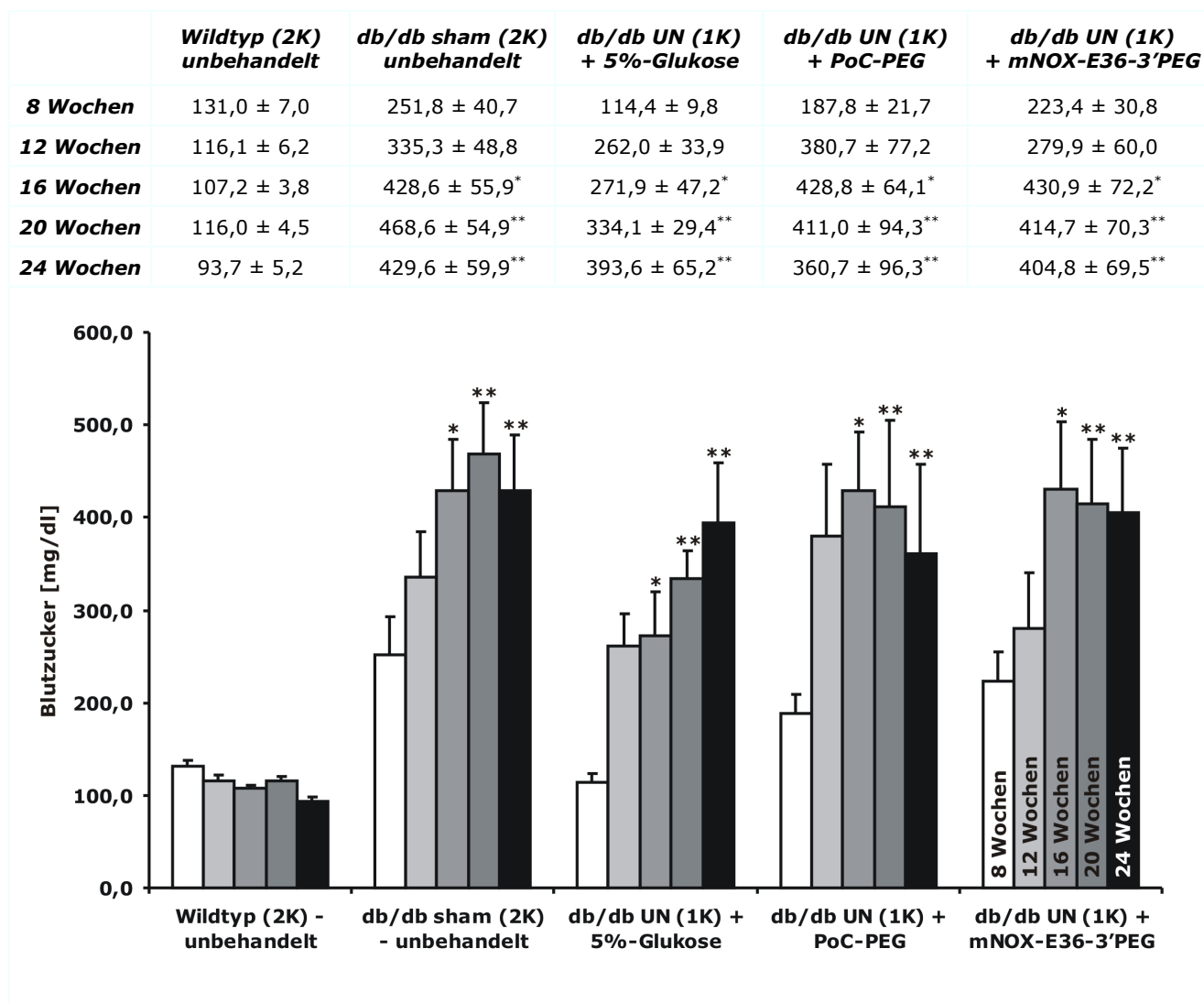


Abbildung 25: Blutzuckerspiegel. * $p < 0,05$ db/db vs. Wildtyp; ** $p < 0,01$ db/db vs. Wildtyp.

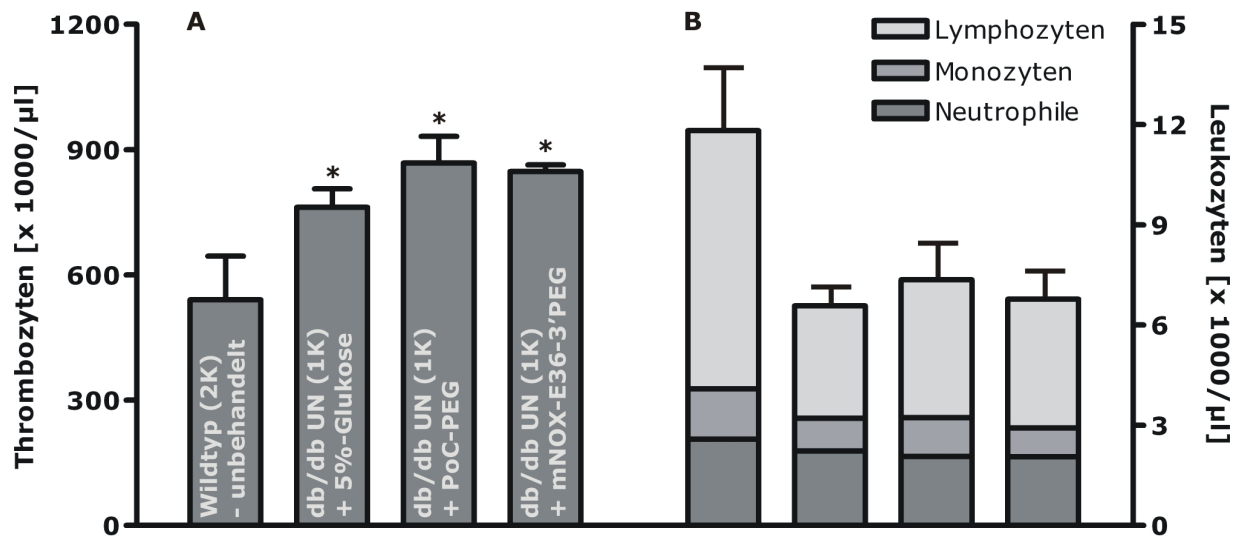
4.1.3 Differentialblutbild

Um die Auswirkungen des Spiegelmers auf das Differentialblutbild zu untersuchen, erhielten jeweils fünf Tiere zweimalig 5%-Glukose, PoC-PEG oder mNOX-E36-3'PEG (subkutane Injektion; jeweils 1 μ l pro Gramm Körpergewicht) 2 und 20 Stunden vor der geplanten Blutentnahme. Anschließend wurden die Leukozyten- und Thrombozytenzahl mittels CoulterCounter bestimmt und die Leukozytenfraktionen durch mikroskopische Untersuchung von Blutaussstrichen differenziert. Die diabetische Stoffwechsellaage führt zu signifikant erhöhten

Thrombozytenzahlen im peripheren Blut. Die Behandlung mit dem Spiegelmer hat dagegen keinen Einfluss auf die Zahl der Thrombozyten (Tabelle 4, Abbildung 26). Im Hinblick auf die Zahl der Leukozyten zeigen die diabetischen Tiere einen Trend zu niedrigeren Leukozytenzahlen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Betrachtet man die prozentuale Verteilung der einzelnen Leukozytenspezies, so lässt sich ebenso ein Trend zu einem höheren Anteil an Neutrophilen bei erniedrigtem Anteil an Lymphozyten feststellen, der sich jedoch nur in der Vehikel-behandelten Gruppe statistisch signifikant auswirkt (Tabelle 4, Abbildung 26)

Tabelle 4: Differentialblutbild. * $p < 0,05$.

	Wildtyp (2K)	db/db (1K)	db/db (1K)	db/db (1K)
	unbehandelt	+ 5%-Glukose	+ PoC-PEG	+ mNOX-E36-3'PEG
Thrombozyten [x 1000/μl]	540,2 \pm 104,8	761,8 \pm 44,6*	868,0 \pm 63,9*	847,2 \pm 16,0*
Leukozyten [x 1000/μl]	11,8 \pm 1,9	6,6 \pm 0,6	7,4 \pm 1,1	6,8 \pm 0,8
Neutrophile [%]	21,8 \pm 3,6	33,6 \pm 7,3	28,0 \pm 5,8	30,2 \pm 2,6
Eosinophile [%]	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Basophile [%]	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2
Monozyten [%]	12,8 \pm 1,0	14,8 \pm 2,6	15,8 \pm 2,2	12,8 \pm 1,5
Lymphozyten [%]	65,4 \pm 4,4	50,8 \pm 7,1	56,0 \pm 6,4	56,8 \pm 2,7



4.1.4 Plasmakonzentration von mNOX-E36-3'PEG und Serumspiegel von Mcp-1

Um die Plasmakonzentration von mNOX-E36-3'PEG zu bestimmen, wurde neun Mäusen im Alter von 20 Wochen und sieben Mäusen im Alter von 24 Wochen jeweils 12 Stunden nach Injektion von mNOX-E36-3'PEG Blut entnommen. Die Plasmakonzentration von mNOX-E36-3'PEG betrugen $2,1 \pm 1,7$ nmol/ml und $2,1 \pm 0,3$ nmol/ml (Abbildung 27).

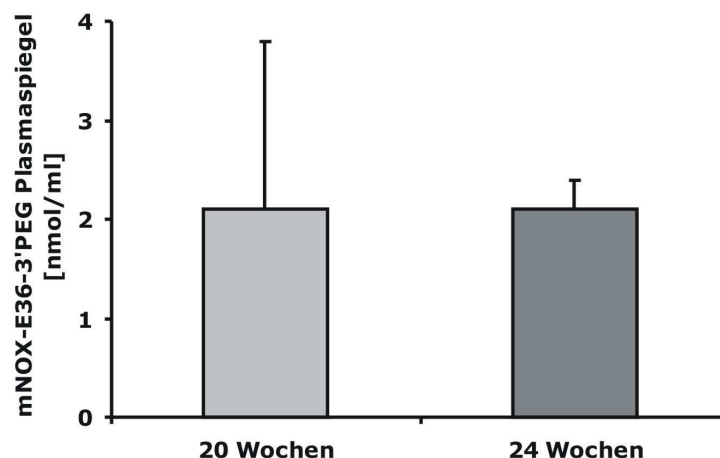


Abbildung 27: Plasmaspiegel von mNOX-E36-3'PEG im Alter von 20 und 24 Wochen, jeweils 12 Stunden nach Injektion. Werte entsprechen den Mittelwerten \pm SD.

Der Serumspiegel von Mcp-1 wurde mittels ELISA zu drei verschiedenen Zeitpunkten (16, 20 und 24 Wochen) bestimmt. Vor Beginn der Behandlung (im Alter von 16 Wochen) zeigen alle Tiere vergleichbar geringe Werte von Mcp-1 im Serum. Bereits im Alter von 20 Wochen zeigen alle Tiere einen Anstieg der Mcp-1-Serumkonzentration, die PoC-PEG-behandelten Tiere in geringem, die mNOX-E36-3'PEG-behandelten Tiere in signifikant größerem Ausmaß. Dieser signifikante Unterschied ist auch im Alter von 24 Wochen feststellbar, obwohl die PoC-PEG-behandelten Tiere einen verhältnismäßig stärkeren Anstieg zeigen (Abbildung 28).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass durch die Behandlung mit dem Spiegelmer Mcp-1 in der Zirkulation zurückgehalten wird (Abbildung 28).

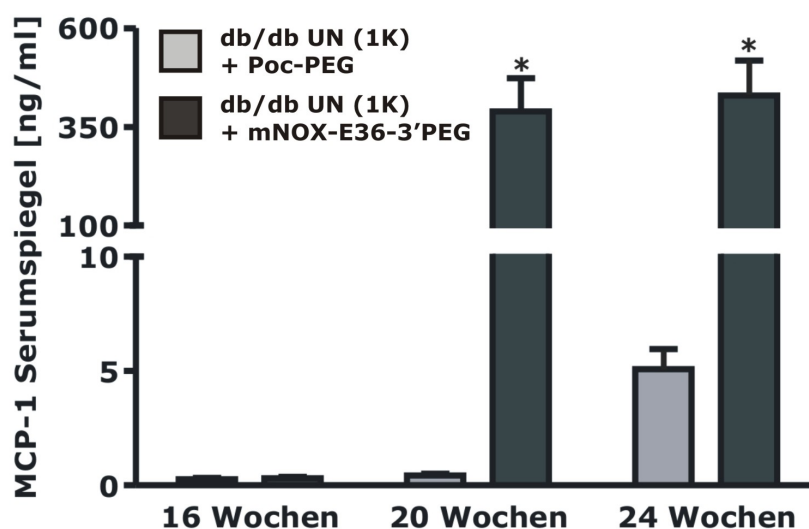


Abbildung 28: Serumspiegel von Mcp-1 bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen. Die Serumspiegel von Mcp-1 wurden mittels ELISA im Alter von 16, 20 und 24 Wochen bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen bestimmt, die mit PoC-PEG (graue Balken) und mNOX-E36-3'PEG (schwarze Balken) behandelt wurden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$.

4.1.5 Anzahl glomerulärer Makrophagen und globale Glomerulosklerose

Das Fehlen von funktionellem Mcp-1 ist assoziiert mit verringerter Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre Kompartiment von db/db-Mäusen [28]. Nachdem mNOX-E36-3'PEG nachweislich die Mcp-1-vermittelte Rekrutierung von Makrophagen sowohl *in vitro* [132] als auch *in vivo* (siehe 4.1.1) zu blockieren imstande ist, sollte durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG die Rekrutierung von Makrophagen in die Niere von db/db-Mäusen mit fortgeschrittener diabetischer Nephropathie beeinflusst werden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte nach 8-wöchiger Behandlung die Organentnahme zur histopathologischen Untersuchung.

Tabelle 5: Histopathologie.

	Wildtyp (2K) unbehandelt	db/db sham (2K) unbehandelt	db/db UN (1K) + 5% Glukose	db/db UN (1K) + PoC-PEG	db/db UN (1K) + mNOX-E36-3'PEG
Glomerulosklerose					
Punktwert 0 (keine Schädigung)	91,0 ± 6,0	10,0 ± 5,0	2,0 ± 3,0	2,0 ± 3,0	14,0 ± 6,0*
Punktwert 1 (1-24 % Schädigung)	5,0 ± 2,0	25,0 ± 5,0	4,0 ± 6,0 ⁺	3,0 ± 5,0	26,0 ± 4,0 [#]
Punktwert 2 (25-49 % Schädigung)	3,0 ± 4,0	30,0 ± 8,0	20,0 ± 13,0	12,0 ± 12,0	36,0 ± 6,0 [#]
Punktwert 3 (50-74 % Schädigung)	1,0 ± 1,0	27,0 ± 7,0	36,0 ± 10,0	41,0 ± 8,0	18,0 ± 5,0 [#]
Punktwert 4 (75-100 % Schädigung)	0,0 ± 0,0	8,0 ± 4,0	38,0 ± 10,0 ⁺	42,0 ± 10,0	6,0 ± 6,0 [#]
Tubulointerstitielle Schädigung					
Tubuluszellschädigung	0,4 ± 0,1	1,73 ± 0,3	4,56 ± 0,8 ⁺	4,46 ± 0,9	2,99 ± 0,5
Tubulusdilatation	0,39 ± 0,0	1,38 ± 0,3	3,97 ± 0,9 ⁺	3,77 ± 0,7	1,97 ± 0,3
Interstitielles Volumen	0,29 ± 0,0	2,21 ± 0,4	3,87 ± 0,5	4,36 ± 1,0	2,04 ± 0,4*
Kollagenablagerung	0,28 ± 0,1	1,99 ± 0,3	2,50 ± 0,4	1,59 ± 0,3	1,01 ± 0,1
Peritubuläre Kapillaren					
MECA32+Kapillaren/hpf	133,23 ± 9,6	116,80 ± 14,3	75,24 ± 15,1 ⁺	75,24 ± 15,1	64,00 ± 4,9
Glomeruläre Proliferation					
Ki67+ Zellen/Glomerulus	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	2,4 ± 0,2 ⁺	3,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2*
Makrophagen					
Mac2+ Zellen/Glomerulus (glomerulär)	0,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2	5,0 ± 0,7 ⁺	5,9 ± 0,4	3,5 ± 0,3*
F4/80+ Zellen/hpf (interstitiell)	3,2 ± 0,3	8,6 ± 1,0	19,2 ± 2,8 ⁺	23,8 ± 3,3	12,3 ± 1,2*

Dargestellt sind jeweils der prozentuale Anteil (Glomerulosklerose) bzw. der Mittelwert (restliche Färbungen) ± SEM. * p < 0,05 mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG, # p < 0,001 mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG, + p < 0,05 1K db/db vs. 2K db/db.

Es konnte nachgewiesen werden, dass mNOX-E36-3'PEG die Anzahl glomerulärer Makrophagen im Vergleich zu den Tieren, die mit PoC-PEG oder Vehikel (5%-Glukose) behandelt wurden, signifikant um 40% bzw. 30 % reduzieren konnte (Tabelle 5, Abbildung 30). Dieses Ergebnis war assoziiert mit einer erniedrigten Anzahl Ki-67-positiver (proliferierender) Zellen im

Glomerulus bei Tieren, die mNOX-E36-3'PEG erhielten (Tabelle 5, Abbildung 30). Damit assoziiert war eine signifikante Verbesserung der globalen Glomerulosklerose bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen (Abbildung 29). Durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG konnte die diabetische Glomerulosklerose auf ein Niveau verbessert werden, das der Schädigung bei gleichaltrigen nicht-uninephrektomierten (2K) db/db-Mäusen entspricht. Daneben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den uninephrektomierten (1K) diabetischen Tieren festgestellt werden, die mit PoC-PEG behandelt wurden und denen, die lediglich das Vehikel (5%-Glukose) erhielten. Das Kontrollspiegelmer PoC-PEG hatte somit weder Einfluss auf die Rekrutierung von Makrophagen (Tabelle 5, Abbildung 30) noch auf die glomeruläre Schädigung bei db/db-Mäusen. Uninephrektomierte (1K) db/db-Mäuse, die mit Vehikel (5%-Glukose) behandelt wurden unterscheiden sich jedoch signifikant von den nicht-uninephrektomierten (2K) db/db-Mäusen und zeigen deutlich stärker geschädigte Glomeruli (Abbildung 29). Dies zeigt, dass durch die Uninephrektomie die Progression der diabetischen Glomerulosklerose beschleunigt wird und belegt damit die Verlässlichkeit des Modells.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die späte Blockade der Mcp-1-vermittelten Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre Kompartiment der Niere durch mNOX-E36-3'PEG vor globaler diabetischer Glomerulosklerose bei db/db-Mäusen schützt.

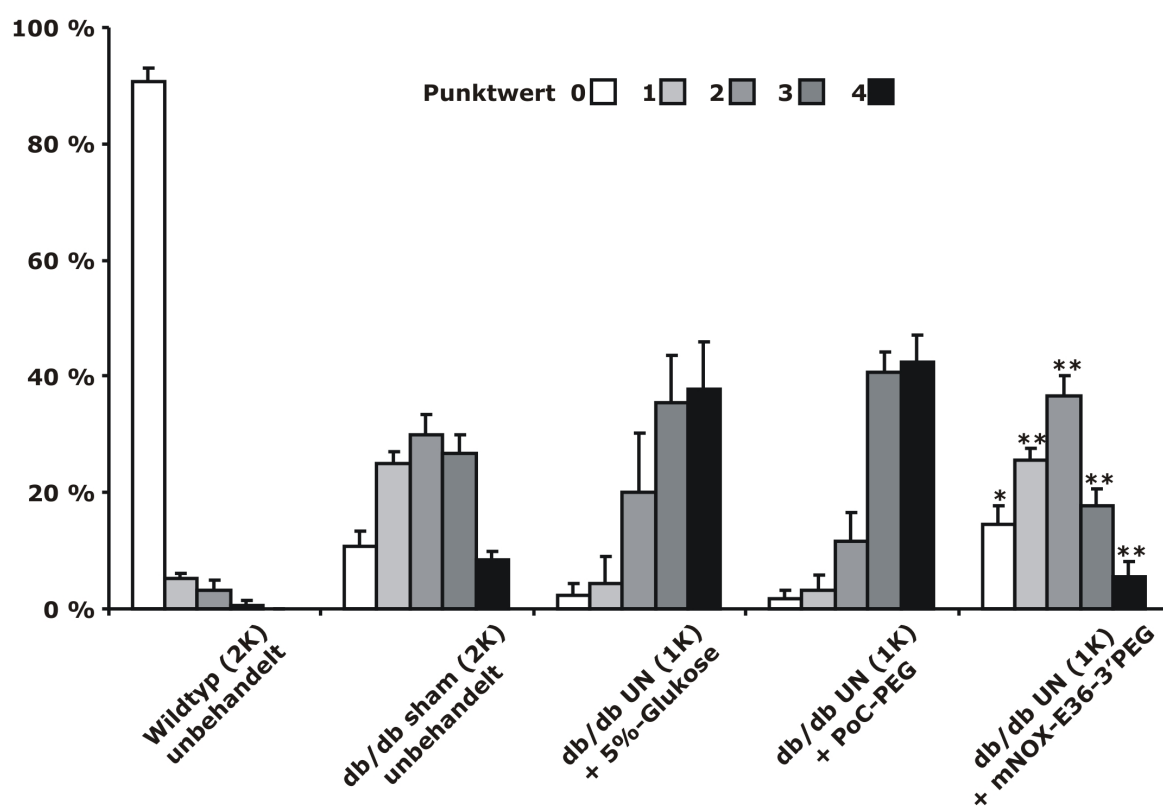


Abbildung 29: Glomerulosklerose. Ausmaß der Glomerulosklerose im Alter von 6 Monaten, dargestellt anhand der prozentualen Verteilung der entsprechenden Punktwerte \pm SEM. Zur besseren Übersichtlichkeit sind lediglich die signifikanten Unterschiede zwischen mNOX-E36-3'PEG und PoC-PEG behandelten Tieren dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

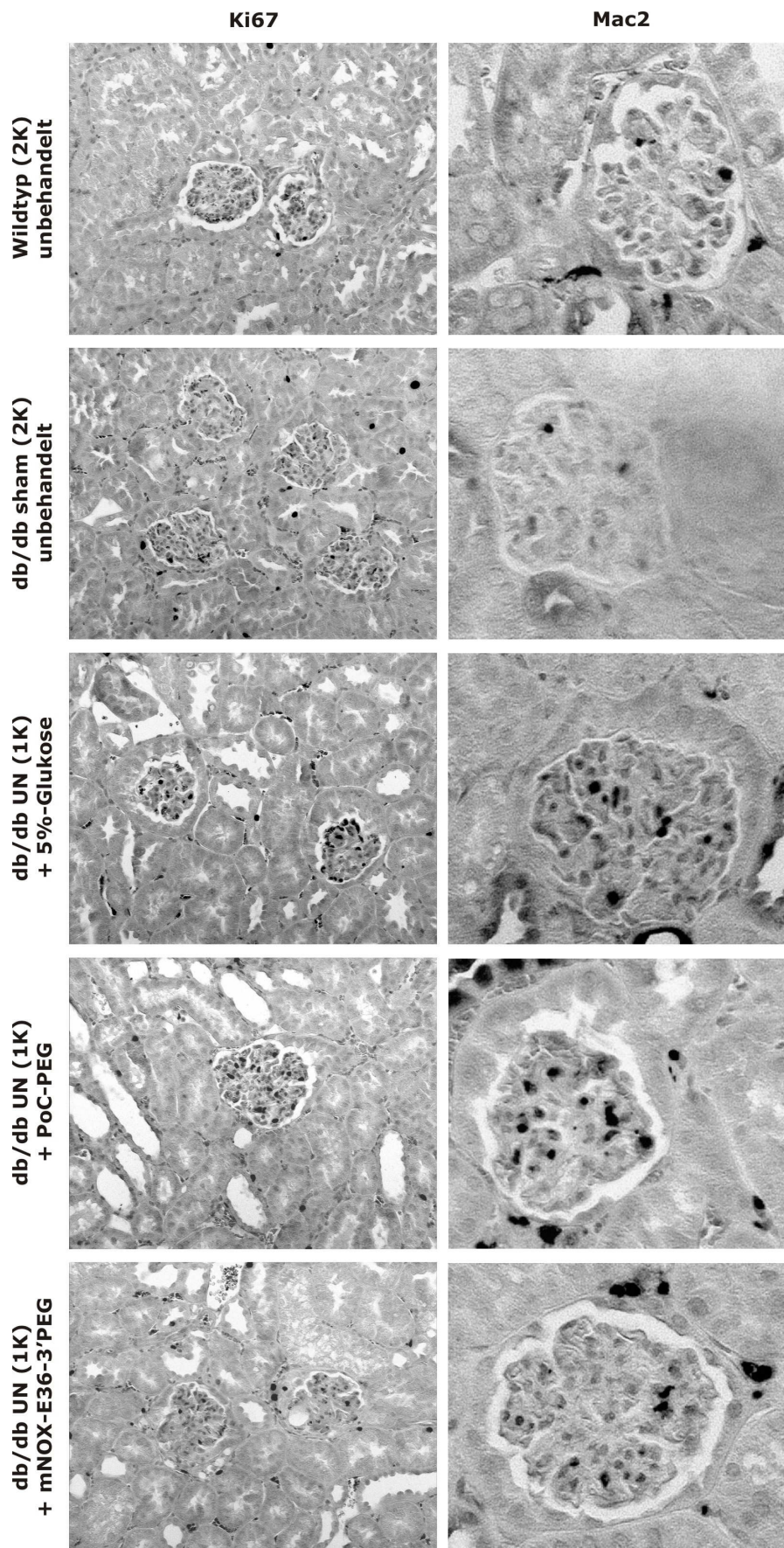


Abbildung 30: Glomeruläre Histopathologie. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ausschnitte jeder Gruppe. Vergrößerung 200x (Ki67), 400x (Mac2).

4.1.6 Anzahl interstitieller Makrophagen und tubulointerstitieller Schaden

Das fortgeschrittene Krankheitsstadium der diabetischen Nephropathie beim Menschen ist assoziiert mit einer signifikanten Zahl an interstitiellen Makrophagen und einer Schädigung des Tubulointerstitiums [17]. Bei diabetischen Mäusen ohne Uninephrektomie ist dies bis zum achten Lebensmonat nicht nachweisbar [27]. Die frühe Uninephrektomie beschleunigt die Entwicklung der tubulointerstitiellen Pathologie bei db/db-Mäusen [163]. Aus diesem Grund wurden die Anzahl interstitieller Makrophagen, die Schädigung der Tubuluszellen (Abflachung oder Nekrose), die Tubulusdilataion und das interstitielle Volumen als Marker der tubulointerstitiellen Schädigung für alle Gruppen im Alter von sechs Monaten mittels Morphometrie bewertet.

Zu diesem Zeitpunkt zeigten die mit dem Vehikel (5%-Glukose) behandelten uninephrektomierten (1K) db/db-Mäuse im Vergleich zu den nicht-uninephrektomierten (2K) db/db-Mäusen eine vermehrte Anzahl interstitieller Makrophagen und eine signifikante Zunahme sowohl der Tubuluszellschädigung als auch der Tubulusdilataion (Tabelle 5, Abbildung 31, Abbildung 32). Die uninephrektomierten Tiere, die das Kontrollspiegelmer erhielten, unterscheiden sich nicht von denen, die lediglich das Vehikel (5%-Glukose) erhielten. Tiere dieser beiden Gruppen zeigen tubulointerstitielle Schäden, die mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium vereinbar sind. Die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG konnte bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen die Anzahl interstitieller Makrophagen um 53 % reduzieren. Daneben konnte durch die Behandlung mit dem Spiegelmer das interstitielle Volumen im Vergleich zu den anderen uninephrektomierten Gruppen signifikant reduziert werden. Die Reduktion der Tubuluszellschädigung und der Tubulusdilataion zeigte keine statistische Signifikanz (Tabelle 5, Abbildung 31, Abbildung 32).

Die Blockade der Mcp-1-vermittelten Rekrutierung von Makrophagen in die Niere schützt demnach vor tubulointerstitieller Schädigung bei diabetischen Mäusen.

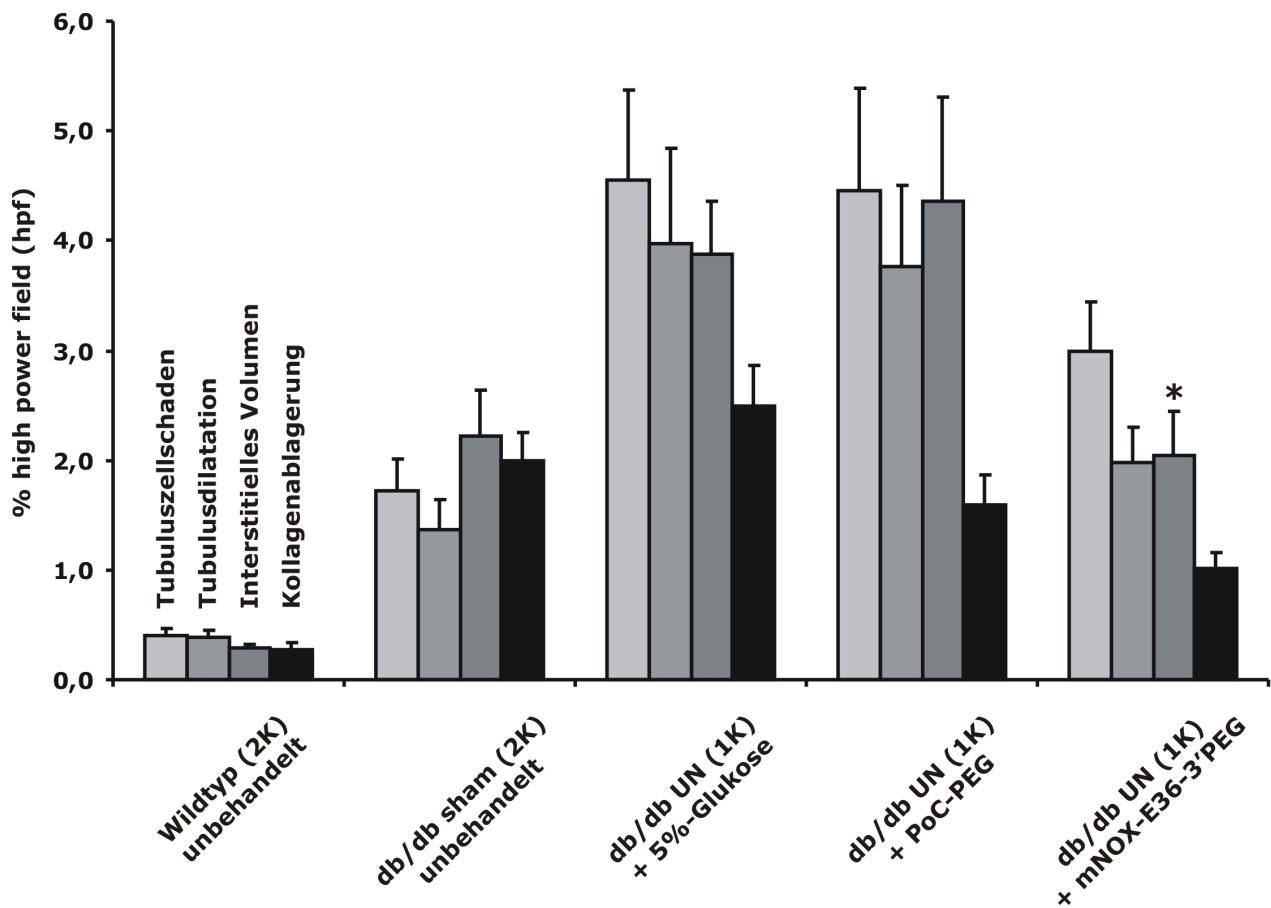


Abbildung 31: Tubulointerstitielle Schädigung im Alter von 6 Monaten. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (prozentualer Anteil pro *high power field*) der morphometrischen Auswertung (siehe 3.2.3) von jeweils 7-10 Tieren. * $p < 0,05$ mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG.

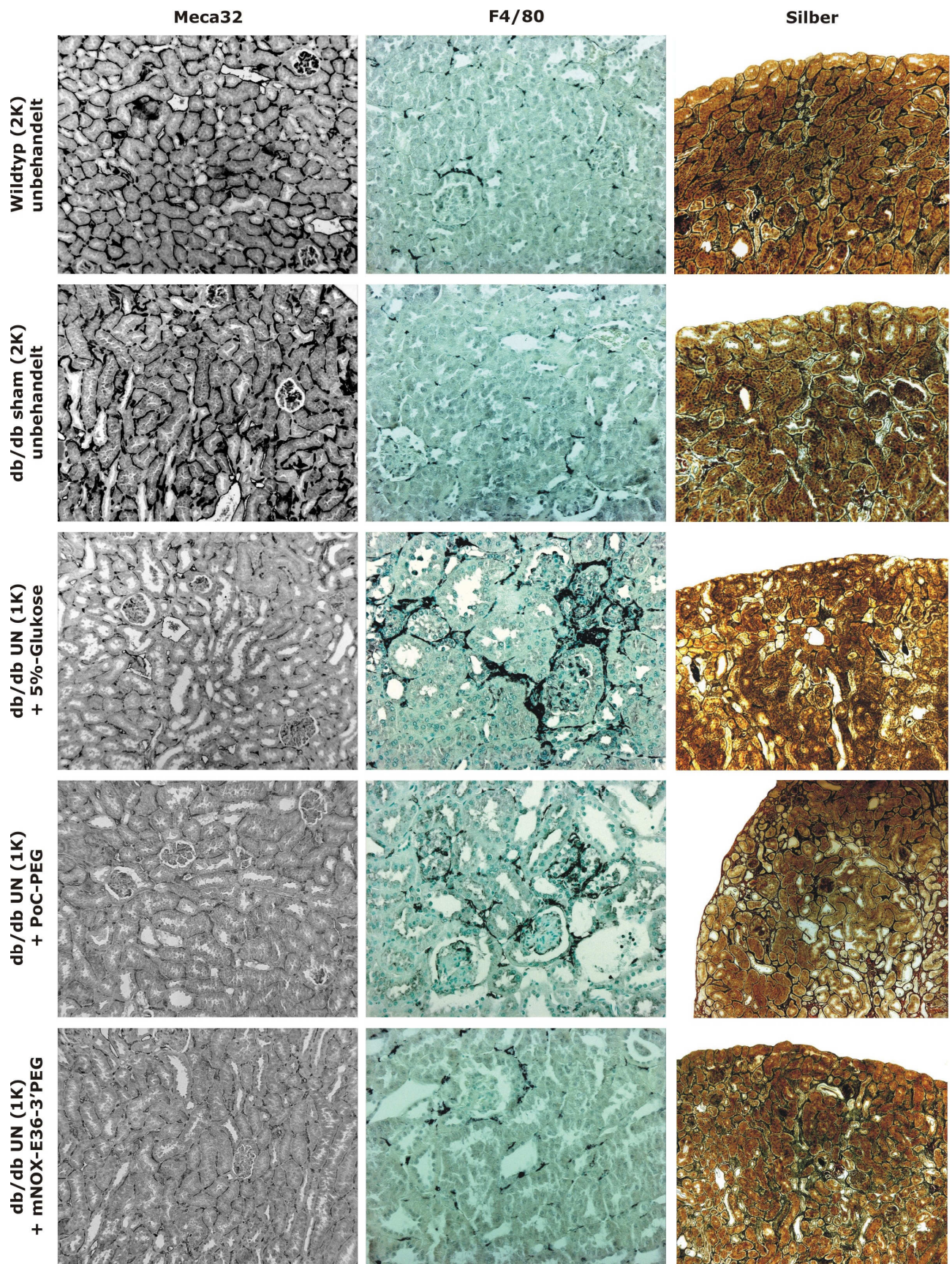


Abbildung 32: Histopathologie des Tubulointerstitiums. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte jeder Gruppe. Vergrößerung 100x (Meca32, Silber), 200x (F4/80).

4.1.7 Expression von Mcp-1, Ccr2 und Tgf- β bei uninephrektomierten db/db-Mäusen

Makrophageninfiltrate verstärken die Entzündungsantwort in geschädigtem Gewebe, d.h. sie verstärken die lokale Expression von Mcp-1. Die aufgrund der Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG erzielte Reduktion der Makrophagen in der Niere müsste daher mit einer reduzierten Expression von Mcp-1 einhergehen. Um diese Hypothese zu prüfen wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt, um die Mcp-1-Expression zu quantifizieren. Tiere, die mit mNOX-E36-3'PEG behandelt wurden, zeigen im Alter von sechs Monaten im Vergleich zu gleichaltrigen PoC-PEG-behandelten Tieren eine Reduktion der Mcp-1-Expression (Abbildung 33).

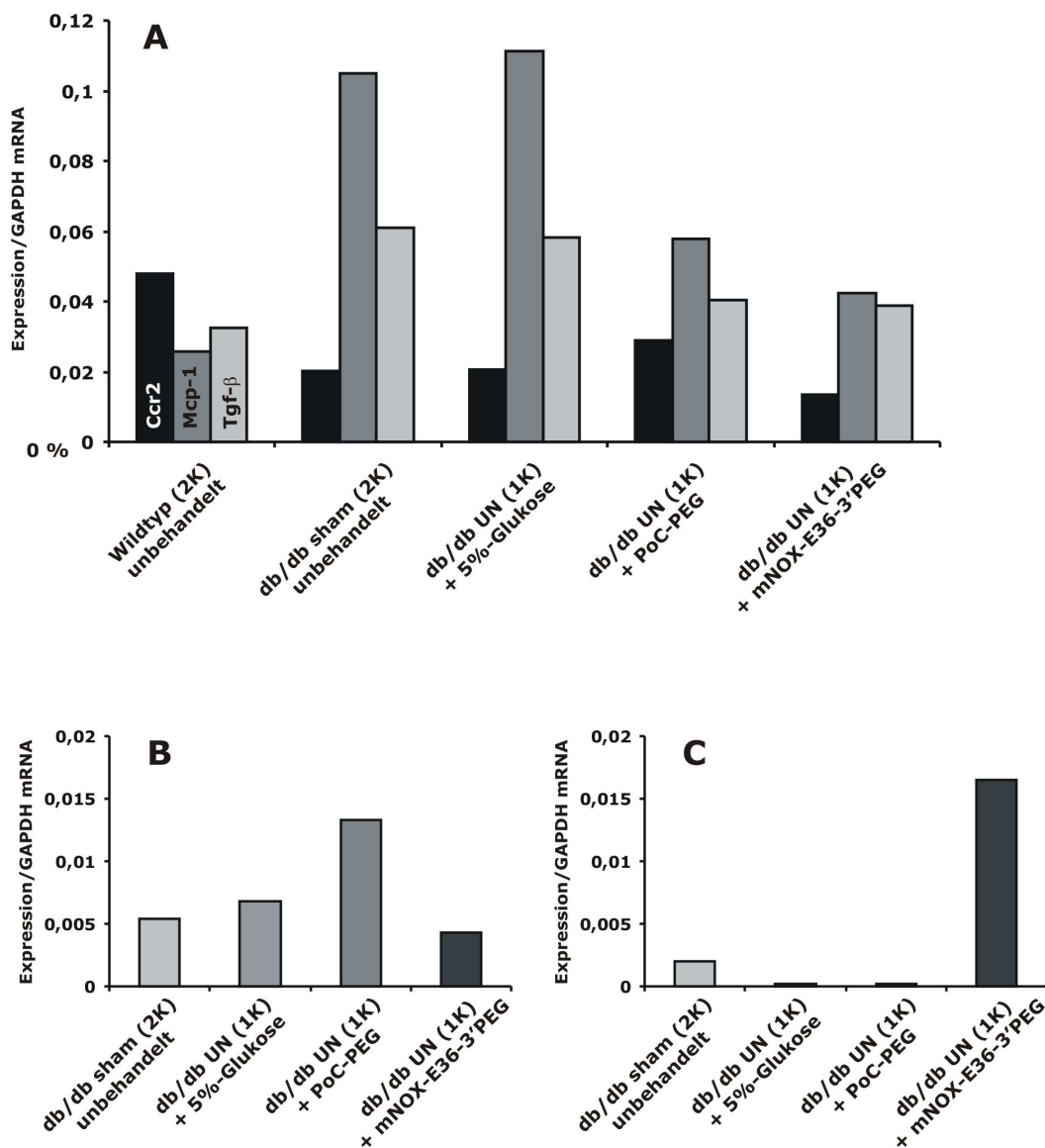


Abbildung 33: mRNA-Expression. **A** Die Expression von Ccr2, Mcp-1 und Tgf- β wurde bestimmt mittels RT-PCR aus gepooltem Nierengewebe von jeweils 6-10 Mäusen jeder Gruppe. Die kompartimentspezifische Expression von Mcp-1 (**B** glomerulär, **C** tubulointerstitiell) wurde bestimmt mittels RT-PCR aus lasermikrodisseziertem Gewebe von jeweils 2 Mäusen jeder Gruppe. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert bezogen auf die GAPDH-Expression.

Um die Expression in den einzelnen Nierenkompartimenten zu untersuchen, wurde eine Lasermikrodissektion durchgeführt, bei der 100 Glomeruli pro Tier aus Gewebeschnitten isoliert wurden, die in Paraffin eingebettet waren. Mit diesem hochreinen Glomerulusgewebe wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG spezifisch die glomeruläre Expression von Mcp-1 bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen im Alter von 6 Monaten reduzierte (Abbildung 33).

Zur weiteren Analyse wurde an histologischen Schnitten eine Immunfärbung für Mcp-1 durchgeführt. Uninephrektomierte (1K) db/db-Mäuse zeigen im Vergleich zu nicht-uninephrektomierten (2K) db/db-Mäusen oder Wildtyp-Mäusen eine verstärkte Anfärbung von Mcp-1 in Glomeruli, Tubuli und interstitiellen Zellen (Abbildung 34). Die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG reduziert die Anfärbung für Mcp-1 in allen Kompartimenten, verglichen mit der Behandlung mit PoC-PEG oder Vehikel deutlich.

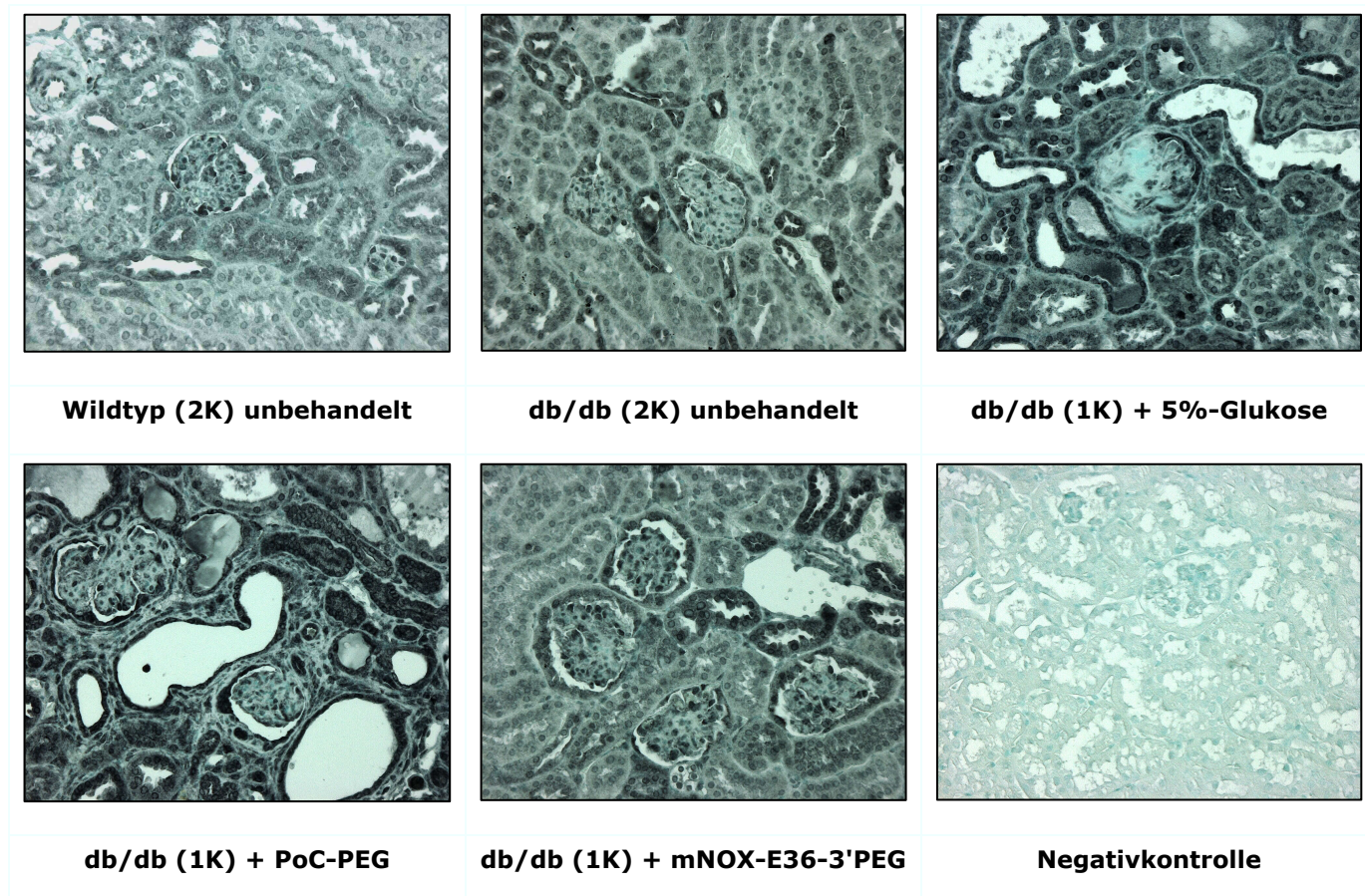


Abbildung 34: Immunfärbung für Mcp-1. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der Nieren von jeweils 6 Monate alten Mäusen jeder Gruppe. Vergrößerung 200x.

Diese Daten zeigen, dass die Blockade der Mcp-1-vermittelten Rekrutierung von Makrophagen in die Niere durch mNOX-E36-3'PEG die lokale Expression von Mcp-1 in uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen reduziert.

Durch die lokale Expression von Mcp-1 werden Makrophagen über den Chemokinrezeptor Ccr2 rekrutiert. In die Niere eingewanderte Makrophagen produzieren profibrotische Zytokine, wie etwa TGF- β , die zur Entstehung der Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose beitragen. Durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG wurde, einhergehend mit einer reduzierten Anzahl an Makrophagen, die Expression sowohl von Ccr2 als auch von Tgf- β in der Niere von db/db-Mäusen reduziert (Abbildung 33). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die therapeutische Blockade von Mcp-1 einen positiven Effekt auf die renale Fibrogenese haben könnte.

4.1.8 Proteinurie

Durch die Behandlung mit dem Spiegelmer konnte die glomeruläre Schädigung reduziert werden, so dass eine Verbesserung der Proteinurie vermutet werden kann. Um dies zu prüfen wurde die Albuminurie mittels ELISA im Spontanurin bestimmt. Im Alter von 6, 10 und 12 Wochen scheiden sowohl die mit PoC-PEG als auch die mit dem Spiegelmer behandelten Tiere nur geringe Mengen Albumin aus. Mit 16 Wochen steigt in beiden Gruppen die Albuminurie an und bleibt bis Ende der Studie etwa auf dem Niveau von 3 mg/dl. Zu keinem Zeitpunkt ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar (Abbildung 35). Die Behandlung mit dem Spiegelmer hat demnach keinen Einfluss auf die Proteinurie von db/db-Mäusen.

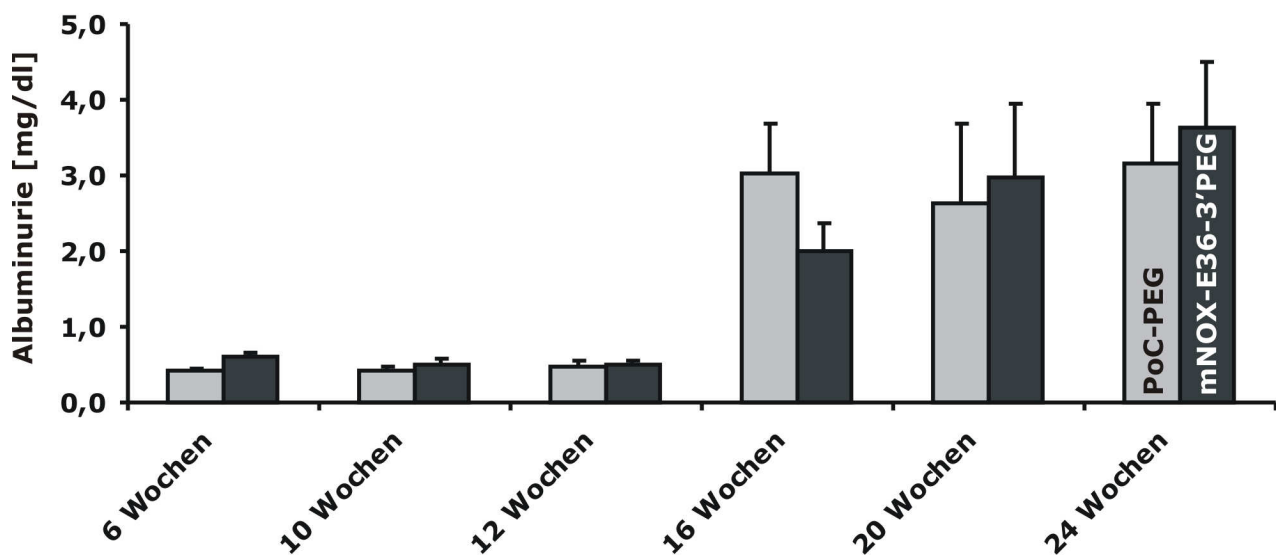


Abbildung 35: Albuminurie. Bis zu einem Alter von 12 Wochen ist die Albuminurie in beiden Gruppen ähnlich gering (< 1 mg/dl). Im Alter von 16 Wochen steigt die Albuminausscheidung in beiden Gruppen an: die Tiere, die PoC-PEG erhielten, steigern die Albuminausscheidung initial stärker (etwa 6-fache Steigerung), bleiben dann aber auf diesem Niveau, während die Spiegelmer-behandelten Tiere die Proteinexkretion kontinuierlich steigern. Zu keinem Zeitpunkt lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM.

4.1.9 Proliferation von Makrophagen und Mesangialzellen

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG die Zahl proliferierender glomerulärer Zellen reduziert, stellte sich die Frage, ob mNOX-E36-3'PEG direkte Effekte auf diese Zellen hat. Verwendet wurden J774-Zellen, eine Monozyten-/Makrophagenzelllinie der Maus sowie eine Mesangialzelllinie der Maus [191], um den Einfluss von mNOX-E36-3'PEG auf die Proliferation dieser Zellen zu überprüfen. Die Proliferation beider Zelllinien war in Abwesenheit von FCS innerhalb von 36 Stunden gering, stieg aber bei Zugabe von FCS deutlich an (Abbildung 36). Die Zugabe von mNOX-E36-3'PEG oder PoC-PEG in verschiedenen Konzentrationen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferationsrate beider Zelltypen. Diese Daten deuten darauf hin, dass mNOX-E36-3'PEG die Zellproliferation von Makrophagen und Mesangialzellen nicht direkt beeinflusst.

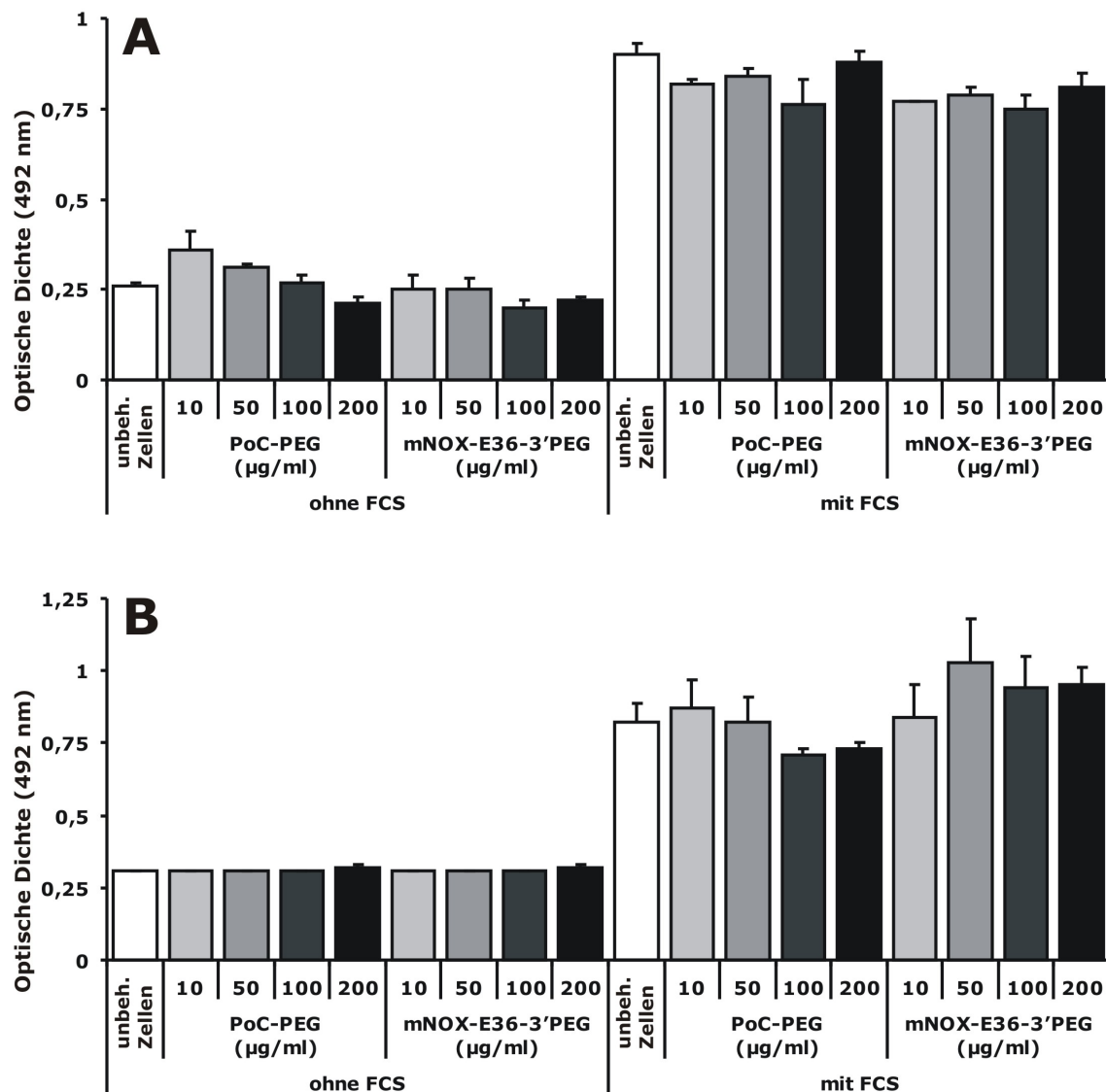


Abbildung 36: Einfluss von mNOX-E36-3'PEG auf die Proliferation von Makrophagen (A) und Mesangialzellen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der optischen Dichte (492 nm).

4.1.10 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Um zu prüfen, ob die Reduktion der pathologischen Schäden mit verbesserter Nierenfunktion einhergeht, wurde die FITC-Inulin-Clearance als Marker der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei db/db-Mäusen gemessen [176]. Die normale GFR beträgt etwa 260 ml/min. [176]. Die nicht-uninephrektomierten (2K) db/db-Mäuse zeigen im Alter von sechs Monaten normale GFR-Werte, wohingegen uninephrektomierte (1K) db/db-Mäuse, die mit PoC-PEG behandelt wurden, eine reduzierte GFR von 112 ± 23 ml/min. zeigen. Durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG kann die GFR signifikant auf Werte von 231 ± 30 ml/min. ($p < 0,001$) verbessert werden (Abbildung 37).

Die Blockade der Mcp-1-vermittelten Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre Kompartiment der Niere kann demzufolge die Nierenfunktion bei db/db-Mäusen verbessern.

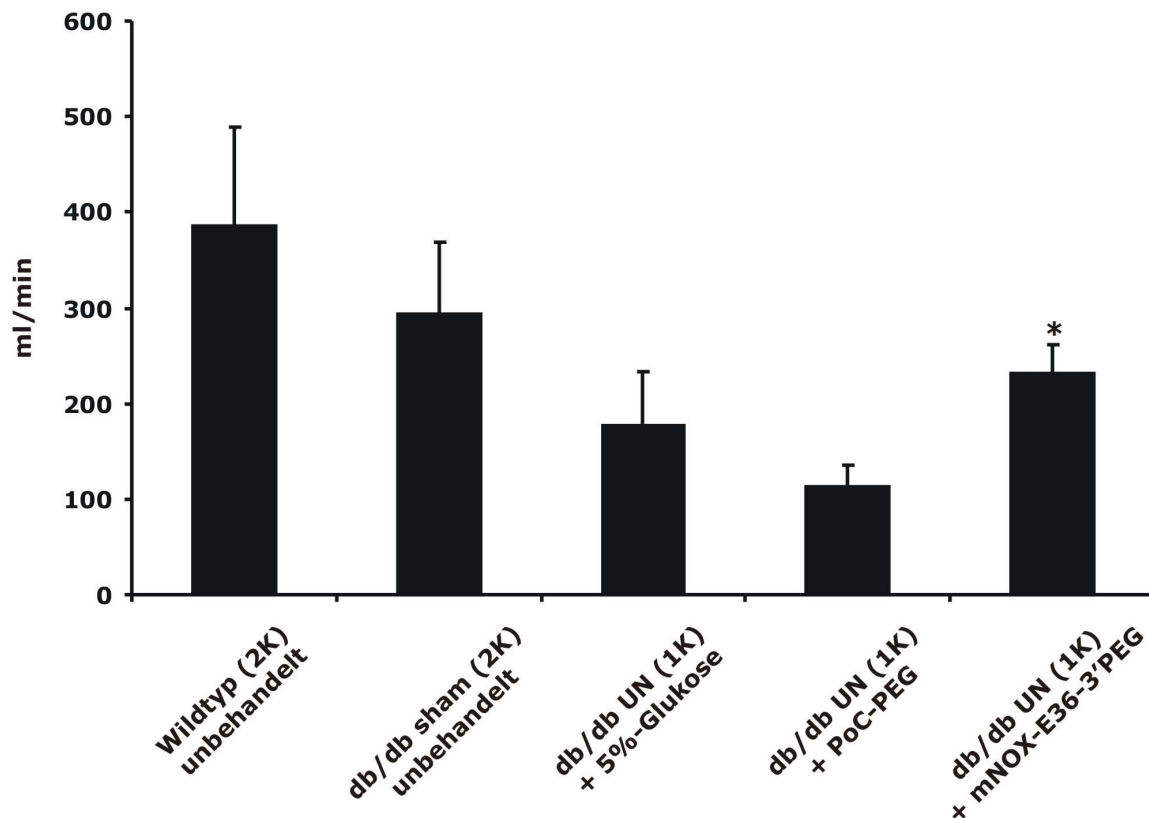


Abbildung 37: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR). Die GFR wurde gemessen mittels Inulin-FITC-Clearance. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,001$ mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG.

4.2 Effekt der Mcp-1-Blockade bei COL4A3^{-/-}-Mäusen

4.2.1 Rekrutierung von Makrophagen in die Niere

Es konnte gezeigt werden, dass das Spiegelmer die Makrophagenrekrutierung in die Niere von db/db-Mäusen signifikant reduzieren kann. Um diese Wirkung auch bei COL4A3^{-/-}-Mäusen zu bestätigen, wurde eine weitere Zelltransferstudie durchgeführt. *Ex vivo* fluoreszenzmarkierte Mac2-positive Monozyten wurden COL4A3^{-/-}-Mäusen im Alter von 8 Wochen intravenös injiziert. Die Mäuse erhielten vorab eine Einzeldosis mNOX-E36-3'PEG, PoC-PEG oder Vehikel (5%-Glukose). Drei Stunden nach Injektion konnte die Einwanderung von Mac2-positiven Monozyten sowohl in das glomeruläre als auch in das interstitielle Kompartiment von Wildtypmäusen und PoC-PEG-behandelten COL4A3^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung mit mNOX-E36-3'PEG konnte die Rekrutierung von Mac2-positiven Zellen in Glomeruli und Tubulointerstitium signifikant reduzieren (Abbildung 38).

Diese Ergebnisse konnten die Wirkung von mNOX-E36-3'PEG in Kollagen-IV-defizienten Mäusen bestätigen und lieferten die Rationale für die Verwendung des Spiegelmers zur Blockade der Makrophagenrekrutierung in COL4A3^{-/-}-Mäusen, einem Modell des Alport-Syndroms.

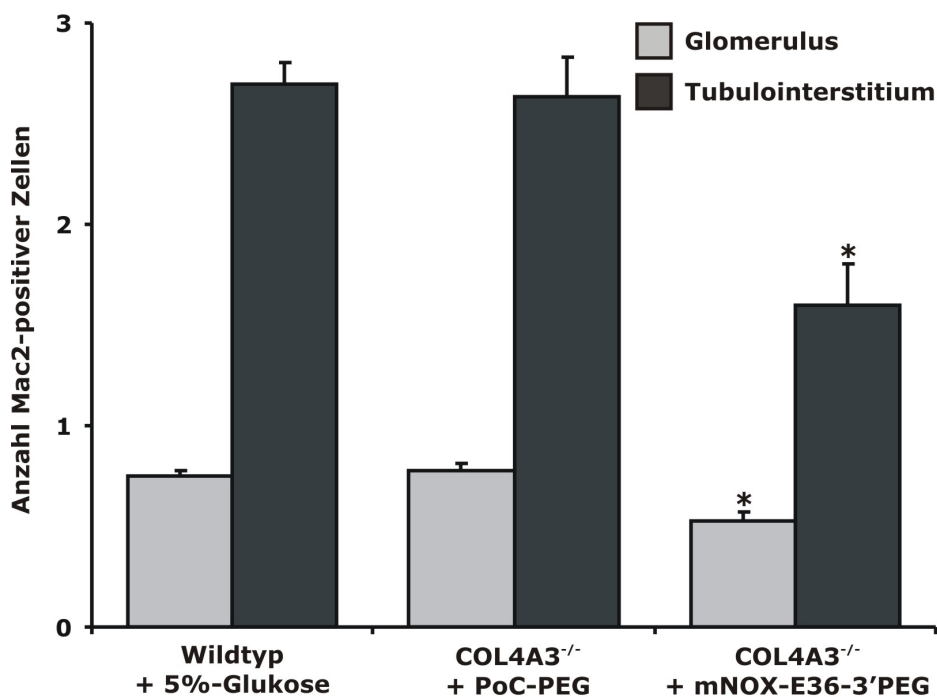


Abbildung 38: mNOX-E36-3'PEG blockiert die Rekrutierung von Monozyten in die Niere. Die schwarzen Balken repräsentieren die Anzahl Mac2-positiver Zellen im tubulointerstitiellen, die grauen Balken im glomerulären Kompartiment der Niere. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten ± SEM. Ausgezählt wurden jeweils 10 Glomeruli bzw. 15 *high power fields* (hpf) pro Tier. * p < 0,05 mNOX-E36-3'PEG vs. 5%-Glukose/PoC-PEG.

4.2.2 Körpergewicht

Nachdem die Effektivität des Spiegelmers nachgewiesen worden war, begann die Behandlung der Versuchstiere, denen ab einem Alter von 3 bzw. 6 Wochen dreimal wöchentlich mNOX-E36-3'PEG, PoC-PEG oder 5%-Glukose subkutan injiziert wurde.

Das Körpergewicht wurde wöchentlich bestimmt. Die Wildtyp-Tiere zeigten im Alter von drei bis sieben Wochen ein signifikant höheres Körpergewicht als die Kollagen-defizienten Mäuse, die sich untereinander weder aufgrund unterschiedlicher Behandlung (mNOX-E36-3'PEG oder PoC-PEG) noch unterschiedlicher Dauer der Behandlung (im Alter von 3 oder 6 Wochen) in ihrem Körpergewicht unterschieden. Ein Einfluss des Spiegelmers auf das Körpergewicht konnte so ausgeschlossen werden (Abbildung 39).

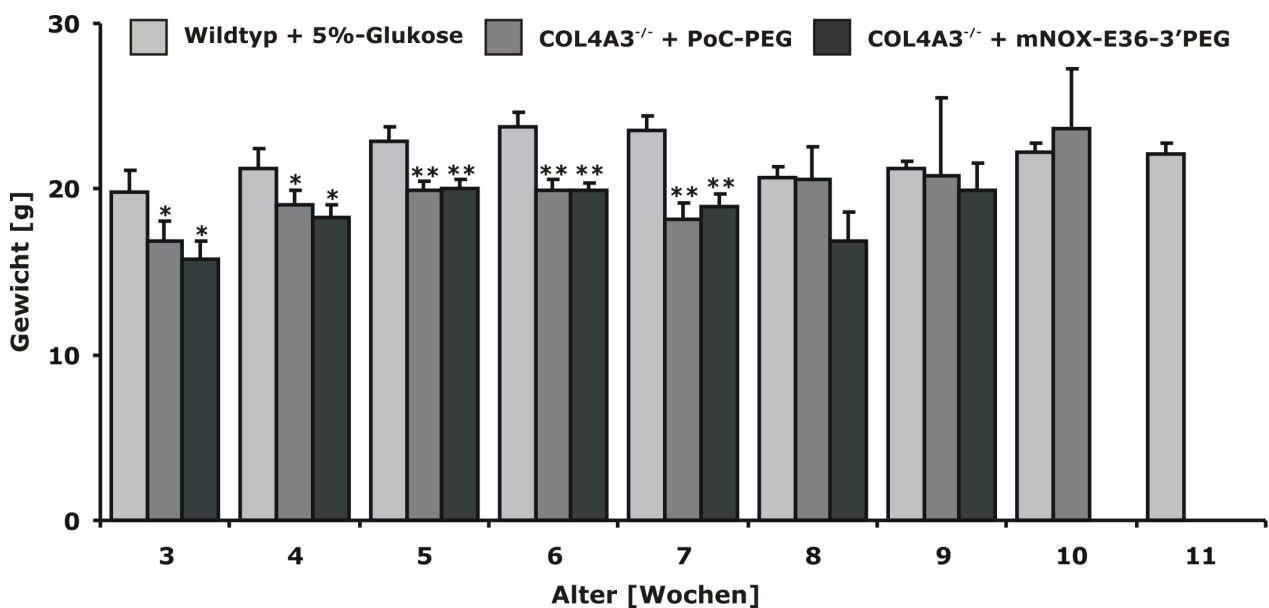


Abbildung 39: Körpergewicht. * $p < 0,05$ COL4A3^{-/-} + mNOX-E36-3'PEG vs. Wildtyp, ** $p < 0,05$ COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp.

4.2.3 Serumspiegel von MCP-1

Der Serumspiegel von Mcp-1 wurde mittels ELISA zum Zeitpunkt der Organentnahme im Alter von 9 Wochen bestimmt. Die Tiere, die mit mNOX-E36-3'PEG behandelt wurden, zeigen signifikant erhöhte Mcp-1-Spiegel im Serum, verglichen mit den PoC-PEG behandelten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass Mcp-1 durch die Spiegelmerbehandlung in der Zirkulation zurückgehalten wird (Abbildung 40).

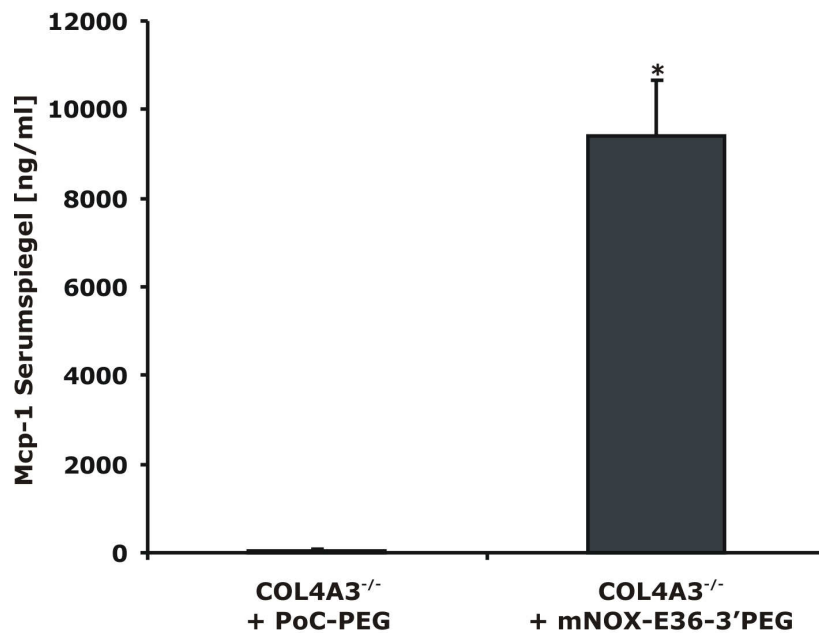


Abbildung 40: Serumspiegel von Mcp-1. Die Serumspiegel von Mcp-1 wurden mittels ELISA im Alter von 9 Wochen bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM.

4.2.4 Ausscheidung von Mcp-1 im Urin

Die Ausscheidung von Mcp-1 im Urin wurde wöchentlich mittels ELISA bestimmt. Im Alter von 5 Wochen lässt sich bei keiner Gruppe eine Mcp-1-Ausscheidung nachweisen. Im Alter von 6 Wochen zeigen diejenigen Tiere, die in der Folgezeit mit mNOX-E36-3'PEG behandelt wurden, bereits signifikant erhöhte Werte an Mcp-1 im Urin, verglichen mit den Tieren der anderen Gruppen. Ab Woche 7 scheiden die COL4A3-defizienten Mäuse signifikant höhere Mengen Mcp-1 im Urin aus als die Wildtyp-Mäuse. Die Mcp-1-Ausscheidung der PoC-PEG-behandelten Tiere nimmt ab Woche 8 stärker zu und gleicht sich der Ausscheidung der mNOX-E36-3'PEG-behandelten Tiere an. Im Alter von 8 und 9 Wochen lässt sich kein Unterschied zwischen den COL4A3-defizienten Mäusen feststellen (Abbildung 41).

Der anfänglich hohe Wert bei den mNOX-E36-3'PEG-behandelten Tieren lässt sich auf vier Tiere (von insgesamt 11 mNOX-E36-3'PEG-behandelten Tieren) zurückführen, die überproportional viel Mcp-1 ausscheiden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese vier Tiere bereits bei Beginn der Behandlung stärker erkrankt waren als die restlichen Tiere (Abbildung 41).

Die insgesamt gesteigerte Ausscheidung von Mcp-1 zu späteren Zeitpunkten zeigt die in beiden Gruppen unabhängig von der Behandlung stattfindende Krankheitsprogression.

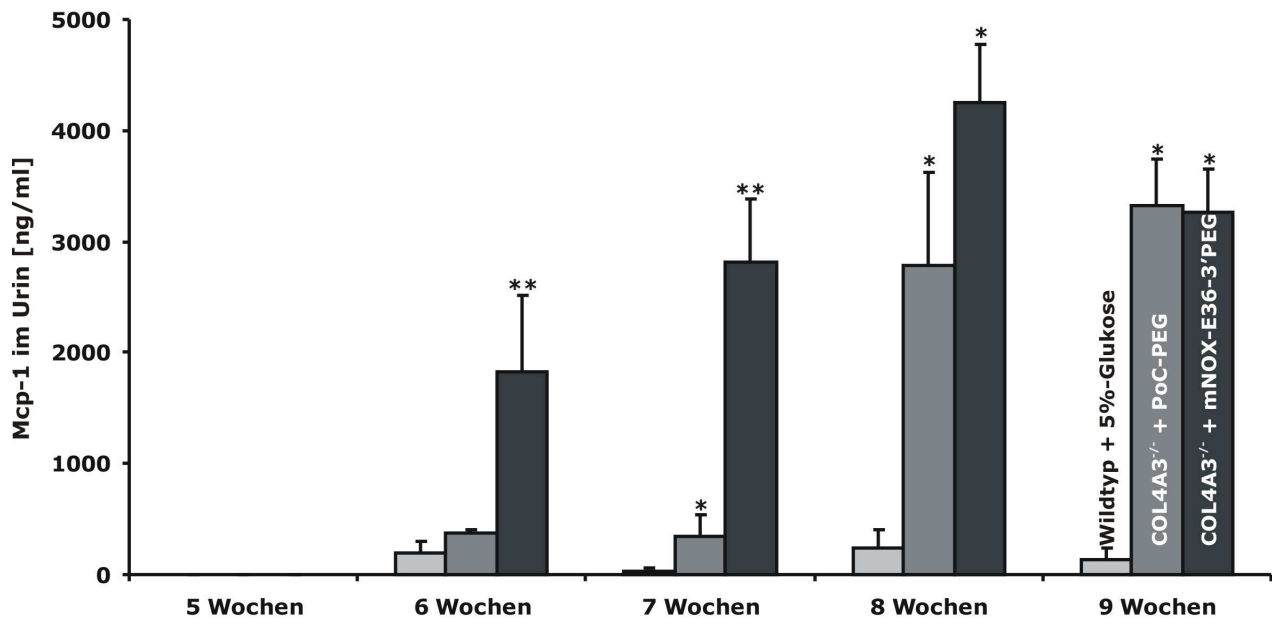


Abbildung 41: Ausscheidung von Mcp-1 im Urin. * $p < 0,05$ COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp; ** $p < 0,05$ mNOX-E36-3'PEG vs. Wildtyp/PoC-PEG.

4.2.5 Proteinurie

Eines der klinischen Merkmale des Alport-Syndroms ist die verstärkte Ausscheidung von Albumin im Urin aufgrund einer glomerulären Schädigung. Um zu prüfen, ob die Behandlung mit dem Spiegelmer die Proteinurie verbessern kann, wurde die Albuminurie mittels ELISA im Spontanurin bestimmt. Bis zu einem Alter von 7 Wochen zeigen die Tiere beider Gruppen keine Proteinurie (Ausscheidung unter 3 mg/dl). Erst im Alter von 8 Wochen kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Albuminausscheidung in beiden Gruppen. Obwohl Tiere, die PoC-PEG erhielten, eine höhere Albuminurie aufweisen als Tiere, die mNOX-E36-3'PEG erhielten, unterscheiden sich beide Gruppen weder im Alter von 8 noch im Alter von 9 Wochen statistisch signifikant (Abbildung 42). Die vorliegenden Daten zeigen, dass durch die Behandlung mit dem Spiegelmer keine signifikante Verbesserung der Proteinurie erreicht werden kann.

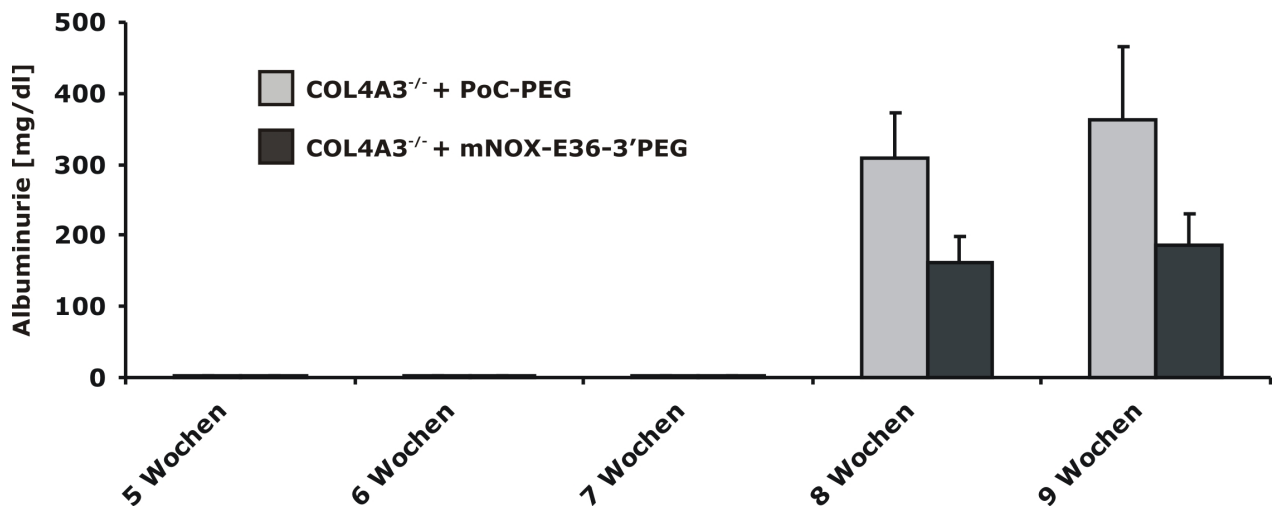


Abbildung 42: Albuminurie. Bis zu einem Alter von 7 Wochen zeigt keine der Gruppen eine signifikante Albuminurie (< 3 mg/dl). Im Alter von 8 Wochen steigt die Albuminausscheidung in beiden Gruppen an, ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen lässt sich jedoch zu keinem Zeitpunkt feststellen.

4.2.6 Überleben

Kollagen-IV-defiziente Mäuse sterben unbehandelt an den Folgen einer rasch progredienten terminalen Niereninsuffizienz. Von einer erfolgreichen Behandlung Kollagen-IV-defizienter Mäuse kann daher nur gesprochen werden, wenn das Überleben der Tiere signifikant verlängert wird.

Tiere, die mit dem Kontrollspiegelmer behandelt wurden, starben durchschnittlich im Alter von 66 Tagen. Tiere, die mNOX-E36-3'PEG erhielten, starben durchschnittlich im Alter von 65 Tagen, es ist somit zwischen beiden Behandlungsgruppen kein Unterschied hinsichtlich des Überlebens erkennbar (Abbildung 43). Die Behandlung mit dem Spiegelmer ist danach nicht in der Lage, das Überleben der Kollagen-IV-defizienten Mäuse zu verlängern.

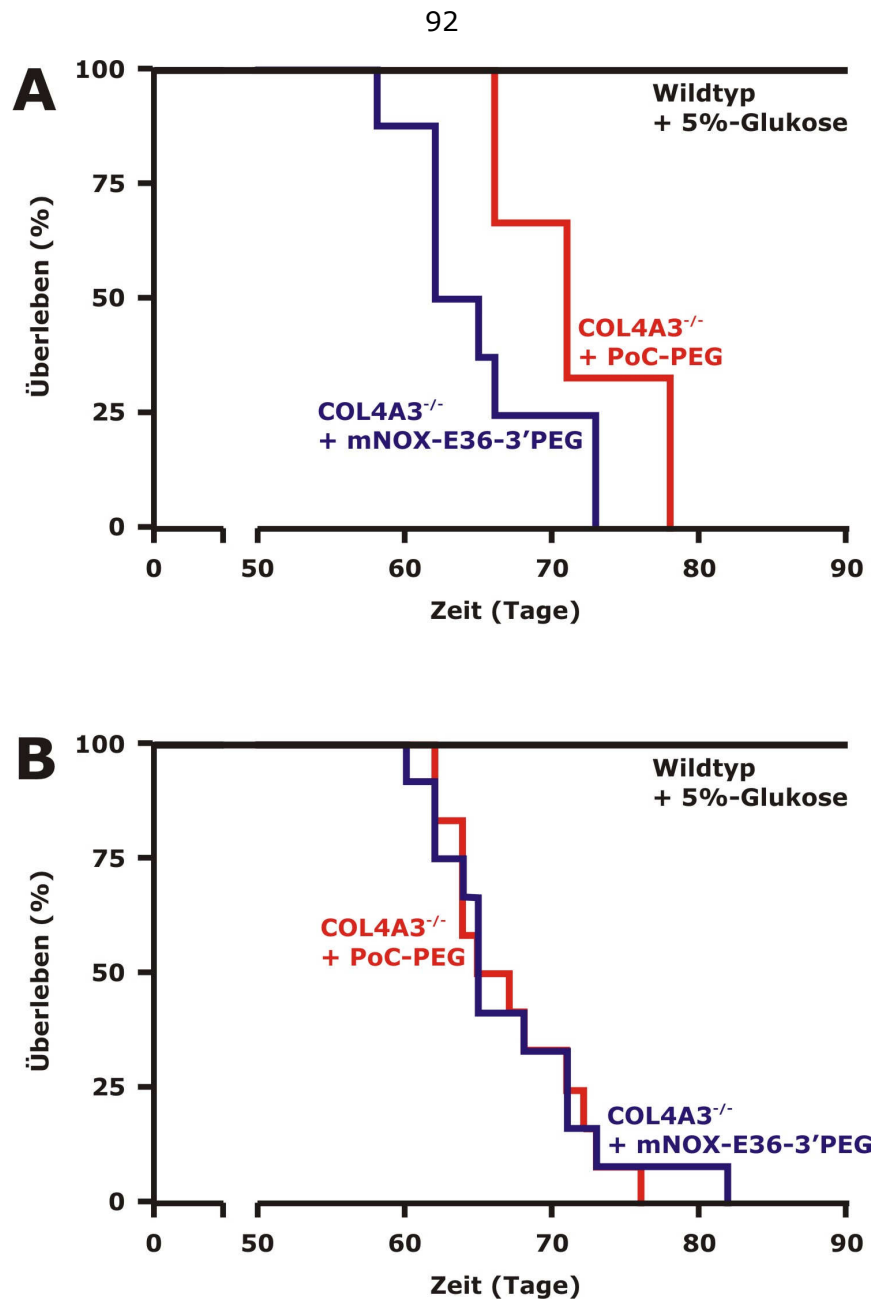


Abbildung 43: Überleben. Dargestellt sind Kaplan-Meier-Kurven bei **A** Behandlungsbeginn im Alter von 3 Wochen, **B** Behandlungsbeginn im Alter von 6 Wochen.

4.2.7 Anzahl glomerulärer Makrophagen und globale Glomerulosklerose

Nachdem gezeigt worden war, dass mNOX-E36-3'PEG in der Lage ist, die Rekrutierung von Makrophagen bei db/db-Mäusen *in vivo* zu blockieren, sollte das Spiegelmer diese Wirkung auch bei Kollagen-IV-defizienten Mäusen zeigen. Um dies zu prüfen erfolgte im Alter von 9 Wochen nach insgesamt dreiwöchiger Behandlung mit dem Spiegelmer bzw. dem Kontrollspiegelmer die Organentnahme zur histopathologischen Untersuchung.

Es konnte nachgewiesen werden, dass mNOX-E36-3'PEG die Anzahl glomerulärer Makrophagen im Vergleich zu den Tieren, die mit PoC-PEG oder Vehikel (5%-Glukose) behandelt wurden, signifikant um 50% reduzieren konnte. Sofern Makrophagen eine entscheidende

pathogenetische Rolle beim Alport-Syndrom spielen, sollte die Reduktion der Makrophagenrekrutierung bei Kollagen-IV-defizienten Mäusen mit einer entsprechenden Verbesserung der Glomerulosklerose assoziiert sein, ähnlich wie bei Spiegelmer-behandelten db/db-Mäusen. Um diese Hypothese zu prüfen wurden Nierenschnitte mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz gefärbt und histopathologisch untersucht. Tiere, die mit Vehikel (5%-Glukose) behandelt wurden, zeigen vor allem gesunde bis leicht geschädigte Glomeruli. Bei Kollagen-IV-defizienten Mäusen lassen sich dagegen überwiegend stark geschädigte Glomeruli erkennen. Die Tiere, die mit dem Spiegelmer behandelt wurden, sind darüber hinaus signifikant stärker geschädigt als die Tiere, die PoC-PEG erhielten (Abbildung 44, Tabelle 6). Die Behandlung mit dem Spiegelmer hatte darüber hinaus auch keinen Einfluss auf die Anzahl Ki-67-positiver (proliferierender) Zellen im Glomerulus.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass durch die Behandlung mit dem Spiegelmer zwar die Rekrutierung von Makrophagen in die Niere blockiert werden kann, dies jedoch auf die glomeruläre Schädigung Kollagen-IV-defizienter Mäuse keinen positiven Einfluss hat.

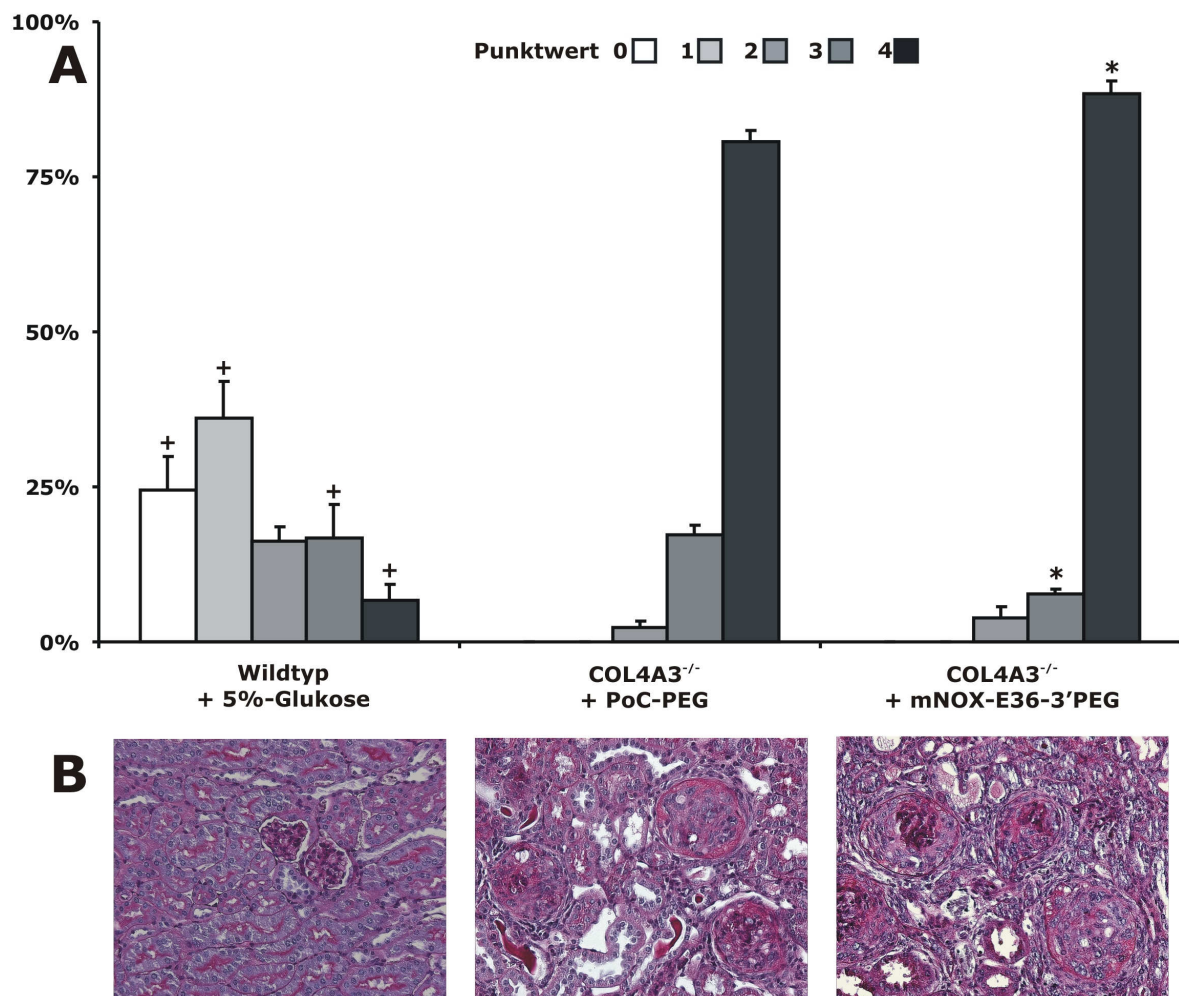


Abbildung 44: Glomerulosklerose. **A** Ausmaß der Glomerulosklerose im Alter von 9 Wochen, dargestellt anhand der prozentualen Verteilung der entsprechenden Punktwerte \pm SEM. ⁺ $p < 0,05$ COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp, ^{*} $p < 0,05$ mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG. **B** Repräsentative Bilder jeder Gruppe, PAS-Färbung, Vergrößerung 200x.

Tabelle 6: Histopathologie.

	Wildtyp + 5%-Glukose n=11	COL4A3 ^{-/-} + PoC-PEG n=12	COL4A3 ^{-/-} + mNOX-E36-3'PEG n=12
Glomerulosklerose			
Punktwert 0 (keine Schädigung)	0,24 ± 0,06**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Punktwert 1 (1-24 % Schädigung)	0,36 ± 0,06**	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Punktwert 2 (25-49 % Schädigung)	0,16 ± 0,03**	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
Punktwert 3 (50-74 % Schädigung)	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ^{##}
Punktwert 4 (75-100 % Schädigung)	0,07 ± 0,03**	0,81 ± 0,02	0,88 ± 0,02 [#]
Tubulointerstitielle Schädigung			
Tubuluszellschädigung (% hpf)	0,00 ± 0,00**	5,82 ± 0,91	8,17 ± 0,77
Tubulusdilatation (% hpf)	0,20 ± 0,30**	11,06 ± 1,91	12,99 ± 1,84
Interstitielles Volumen (% hpf)	1,00 ± 0,60**	13,19 ± 2,47	19,12 ± 2,77
Proliferation			
Ki67+ Zellen/Glomerulus	0,36 ± 0,08*	2,98 ± 0,23	2,33 ± 0,21
Ki67+ Zellen/hpf	1,44 ± 0,15**	20,08 ± 1,14	16,93 ± 0,09
Makrophagen			
Mac2+ Zellen/Glomerulus (glomerulär)	0,09 ± 0,03**	1,45 ± 0,15	0,67 ± 0,10 ^{##}
F4/80+ Zellen/hpf (interstitiell)	0,86 ± 0,16**	11,58 ± 1,59	8,08 ± 1,25 [#]

Dargestellt sind jeweils der prozentuale Anteil (Glomerulosklerose) bzw. der Mittelwert (restliche Färbungen) ± SEM. * p < 0,05 COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp, ** p < 0,001 COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp, # p < 0,05 mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG, ## p < 0,001 mNOX-E36-3'PEG vs. PoC-PEG.

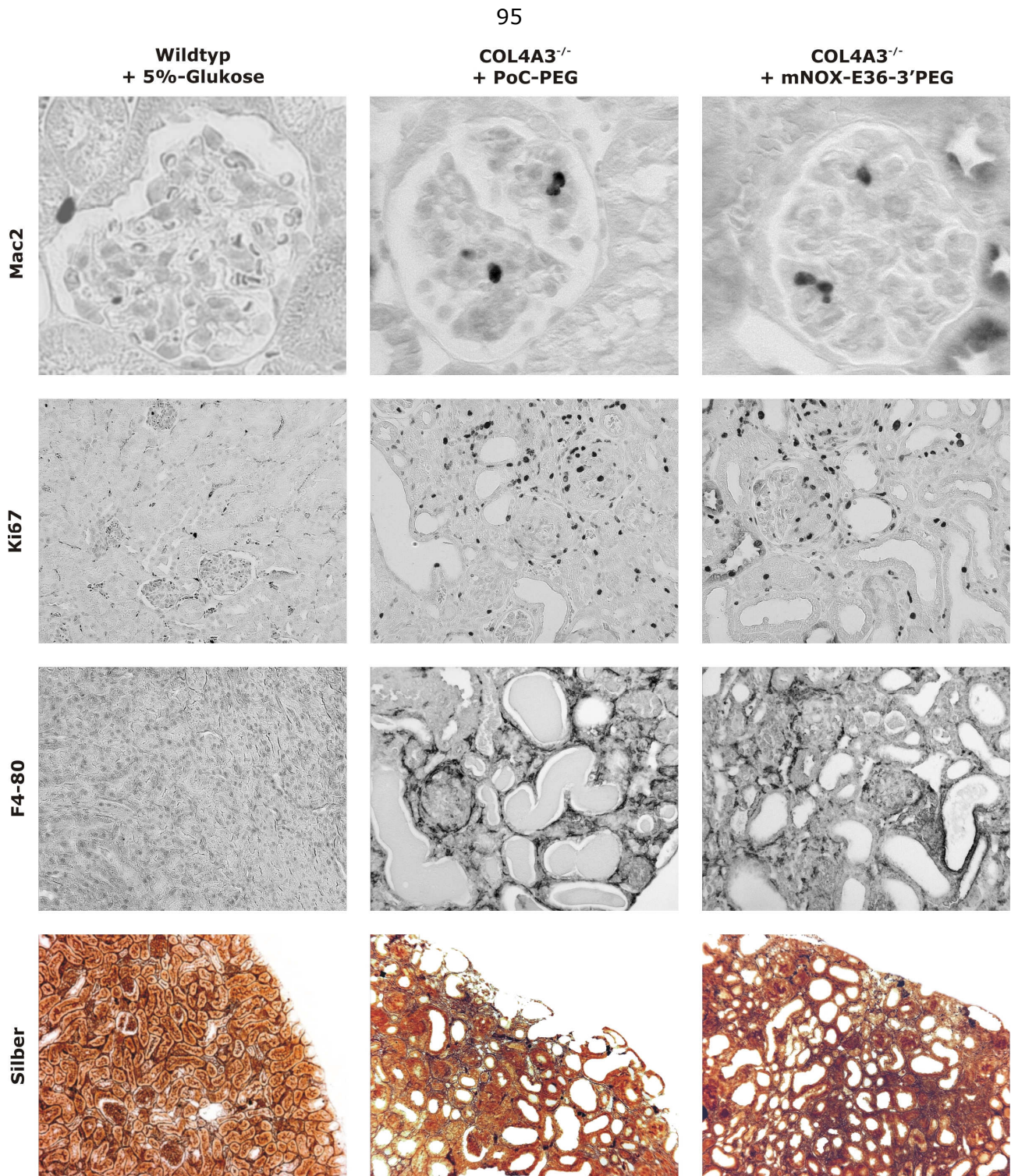


Abbildung 45: Histopathologie. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte jeder Gruppe. Vergrößerung 100x (Silber), 200x (Ki67, F4/80), 400x (Mac2).

4.2.8 Anzahl interstitieller Makrophagen und tubulointerstitieller Schaden

Wildtyp-Tiere, die 5%-Glukose erhielten, zeigen nur vereinzelte Makrophagen im Interstitium und damit einhergehend fehlende tubulointerstitielle Schädigung. Kollagen-IV-defiziente Mäuse, die PoC-PEG erhielten, weisen signifikante Makrophageninfiltrate und stark geschädigte Tubuli auf. Durch die Behandlung mit dem Spiegelmer konnte die Anzahl tubulointerstitieller

Makrophagen signifikant um 30% reduziert werden (Tabelle 6). Diese Reduktion hatte jedoch weder Einfluss auf die Tubuluszellschädigung, auf die Tubulusdilatation noch auf die Zunahme des tubulointerstitiellen Volumens (Abbildung 46). Auch die Anzahl Ki-67-positiver (proliferierender) Zellen im Tubulointerstitium wurde durch die Spiegelmer-Behandlung nicht beeinflusst (Tabelle 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Blockade der Mcp-1-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen mit mNOX-E36-3'PEG keinen Einfluss auf die histologischen Nierenschäden hat.

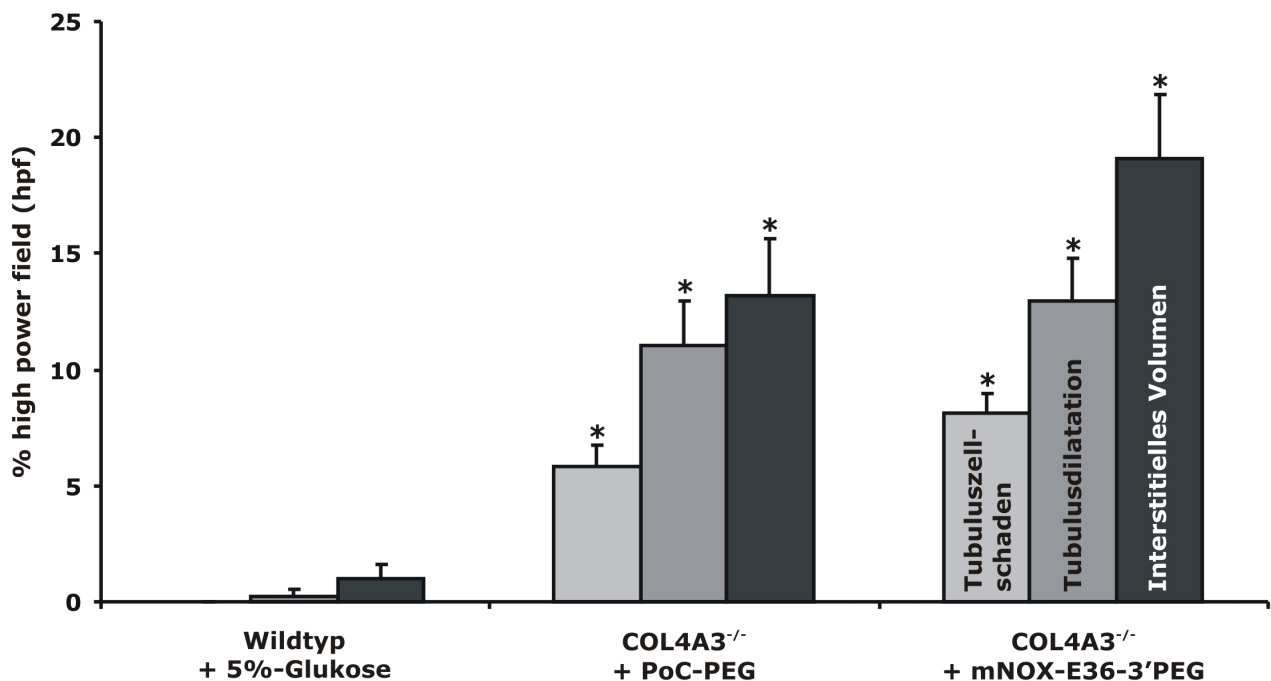


Abbildung 46: Tubulointerstitielle Schädigung im Alter von 9 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (prozentualer Anteil pro *high power field*) der morphometrischen Auswertung (siehe 3.2.3) von jeweils 12 Tieren. * $p < 0,001$ COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp.

4.2.9 Expression von Mcp-1 und Ccr2

Die durch die Spiegelmer-Behandlung erzielte Reduktion der Makrophagen in der Niere müsste mit einer reduzierten Expression von Mcp-1 einhergehen. Um diese Hypothese zu prüfen wurde eine real-time RT-PCR durchgeführt, um die Mcp-1-Expression zu quantifizieren.

Wildtyp-Mäuse, die 5%-Glukose erhielten, zeigen eine nur sehr geringe Expression von Ccr2 und Mcp-1. Zu Beginn der Behandlung im Alter von 6 Wochen exprimieren die COL4A3^{-/-}-Mäuse bereits signifikant mehr Ccr2 und Mcp-1. Im weiteren Verlauf wird die Expression nur noch geringfügig gesteigert, ein signifikanter Zuwachs ist nur in der PoC-PEG-behandelten

Gruppe für die Ccr2-Expression festzustellen. Durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG konnte die Expression von Ccr2 und Mcp-1 nicht beeinflusst werden (Abbildung 47).

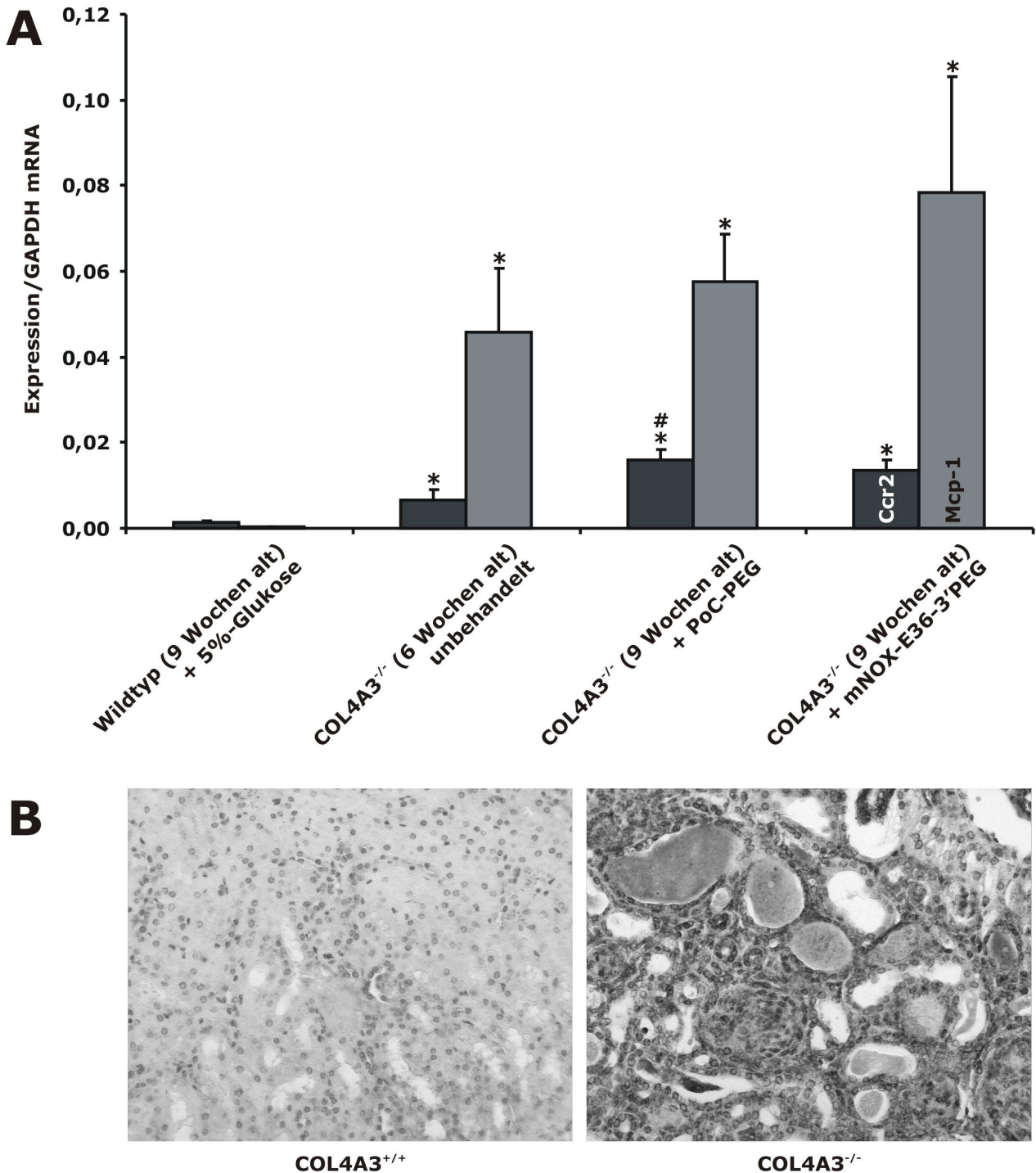


Abbildung 47: mRNA-Expression von Ccr2 und Mcp-1. **A** Die Expression von Ccr2 und Mcp-1 wurde bestimmt mittels RT-PCR aus gepooltem Nierengewebe von jeweils 6-10 Mäusen jeder Gruppe. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM bezogen auf die GAPDH-Expression. * $p < 0,05$ COL4A3^{-/-} vs. Wildtyp; # $p < 0,05$ PoC-PEG vs. unbehandelt. **B** Immunfärbung für Mcp-1. Dargestellt sind jeweils repräsentative Ausschnitte von Wildtyp- bzw. Kollagen-IV-defizienten Mäusen.

5 Diskussion

Die durch Chemokine vermittelte Infiltration von Leukozyten scheint eine bedeutende Rolle bei der Progression der chronischen Niereninsuffizienz zu spielen. Die therapeutische Blockade von Chemokinen sollte daher die Einwanderung von Leukozyten in die Niere verringern und mit einer Progressionsverlangsamung einhergehen. Durch die Blockade von Mcp-1 mit dem Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG konnte bei der uninephrektomierten db/db-Maus, einem Modell der fortgeschrittenen diabetischen Nephropathie, und der Kollagen-IV- α_3 -defizienten Maus (COL4A3^{-/-}), einem Modell des autosomal-rezessiven Alport-Syndroms, die Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre und tubulointerstitielle Kompartiment der Niere reduziert werden. Diese Reduktion des Makrophageninfiltrates war jedoch nur bei der db/db-Maus mit geringerer glomerulärer und tubulointerstitieller Gewebeschädigung, verbesserter Nierenfunktion und damit einer Verlangsamung der Progression assoziiert, während es bei der COL4A3^{-/-}-Maus keinen Einfluss auf die Nierenpathologie und das Überleben der Tiere hatte.

Aptamere sind Oligonukleotide, die an Zielmoleküle binden und damit deren biologische Funktion antagonisieren können. Anders als Aptamere sind die aus Oligonukleotiden bestehenden Spiegelmere nukleaseresistent und damit ohne weitere Modifikation biologisch stabil [127]. Das Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG bindet mit hoher Affinität an Mcp-1 der Maus und blockiert dessen biologische Funktion schon in geringen Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Es wurde bereits gezeigt, dass mNOX-E36-3'PEG keine Interferon- α -Synthese in Dendritischen Zellen über RNA-Erkennungsrezeptoren induziert [132]. Insgesamt sind Spiegelmere aber noch nicht ausreichend charakterisiert. Gibt es langfristige Effekte auf den Metabolismus? Wie wirkt sich die Gabe des Spiegelmers über längere Zeit aus? Wie wird das Spiegelmer eliminiert? Lagern sich möglicherweise Spiegelmer-Protein-Komplexe im Körper ab? Gibt es toxische Nebeneffekte der Spiegelmere? Um diese Fragen zu klären, sind langfristige und umfangreiche Folgestudien erforderlich, die derzeit bereits durchgeführt werden. Die Herstellerfirma konnte beispielsweise in ersten Testreihen an Ratten und Primaten toxische Effekte der Spiegelmere ausschließen (bisher unveröffentlichte Daten).

In den vorliegenden und in einer früheren Studie [132] konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit dem Spiegelmer die Konzentration von Mcp-1 im Serum stark ansteigt, d.h. in der Zirkulation zurückgehalten wird. Ähnliche Effekte wurden nach Gabe von anti-Mcp-1-Antikörpern beschrieben [91]. Unklar bleibt, ob dieses gemessene Mcp-1 an das Spiegelmer gebunden und damit inaktiv ist, da es an geeigneten Enzymen fehlt, die mögliche Komplexe aus Spiegelmer und Mcp-1 prozessieren und sie damit PCR-Methoden zugänglich machen könnten. Auch andere Nachweismethoden eines solchen Komplexes scheiterten bisher, etwa in einer Studie zum anti-Ghrelin-Spiegelmer, in der ebenfalls eine hohe Serumkonzentration des Zielproteins nachgewiesen wurde [200]. Indirekt kann jedoch auf die Inaktivierung von Mcp-1 geschlossen werden. In einem Chemokinmigrationsexperiment konnte nachgewiesen werden, dass mNOX-E36-3'PEG dosisabhängig die Migration von Makrophagen in Richtung eines Mcp-1-

Gradienten mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von etwa 3 nM blockiert (unveröffentlichte Daten). Durch Verwendung von PoC-PEG konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Würde das Spiegelmer lediglich den Chemokingradienten beeinflussen, d.h. Mcp-1 in der Zirkulation zurückhalten ohne dessen biologische Funktion zu blockieren, hätte die Makrophagenmigration nicht gestört werden können. Außerdem müsste in diesem Fall die Anzahl der Makrophagen im Blut erhöht sein, was nicht gezeigt werden konnte. Aus diesem Grund wurde mNOX-E36-3'PEG als passender *in vivo* Antagonist von Mcp-1 angesehen.

5.1 Effekt der Mcp-1-Blockade bei db/db-Mäusen

Es gibt Hinweise auf eine pathogenetische Rolle von Mcp-1 bei der experimentellen diabetischen Nephropathie. Mcp-1-defiziente Mäuse sind vor glomerulärer Schädigung im Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus Typ 1 geschützt [29]. Auch Mcp-1-defiziente db/db-Mäuse, ein Modell des Typ-2-Diabetes, sind geschützt vor einer Progression der diabetischen Nephropathie [28]. Obwohl die Daten Mcp-1-defizienter diabetischer Mäuse eine pathogenetische Rolle von Mcp-1 bei der diabetischen Nephropathie nahe legen, kann nicht vorhergesagt werden, ob eine Mcp-1-Blockade nach Beginn der Erkrankung ebenso protektiv wirkt. Es ist daher nötig, Mcp-1 mit passenden Antagonisten, etwa mNOX-E36-3'PEG zu blockieren, wenn die Erkrankung bereits begonnen hat.

Es ist bekannt, dass Mcp-1 die Rekrutierung von Makrophagen in entzündetes Gewebe vermittelt [11]. In beiden oben genannten Studien ist ein Fehlen von Mcp-1 ebenso assoziiert mit einer Reduktion glomerulärer Makrophagen. In der vorliegenden Studie wird der experimentelle Nachweis erbracht, dass die Blockade von Mcp-1 mit mNOX-E36-3'PEG die Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre und interstitielle Kompartiment der Niere effektiv blockiert. Die Hypothese ist, dass durch die Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG die Zahl renaler Makrophagen bei db/db-Mäusen, einem experimentellem Modell des Typ-2-Diabetes, reduziert werden kann, was mit reduzierter Nierenschädigung einhergehen sollte.

Für die medizinische Forschung sind passende Tiermodelle unerlässlich. Für den Diabetes mellitus ist eine Vielzahl von verschiedenen Mausmodellen kommerziell verfügbar. Sowohl die einzelnen Modelle wie auch die zugrundeliegenden Mausstämme unterscheiden sich hinsichtlich der Ausprägung der diabetischen Nephropathie erheblich, ein optimales Mausmodell existiert nicht [23]. Wir wählten das Modell der db/db-Maus, da sie kommerziell in vielen Stämmen verfügbar sind, ihre Haltung unproblematisch ist und die Erkrankung nicht durch gesonderte Intervention induziert werden muss. Die Mäuse zeigen schon früh eine deutliche Hyperinsulinämie und Hyperglykämie [199], was dem Typ 2 Diabetes mellitus beim Menschen nahe kommt. Daneben ist es das am meisten verwendete Modell des Typ 2 Diabetes mellitus, was die Ergebnisse unserer Studie gut mit anderen vergleichbar macht. Wir wählten Mäuse im C57BLKS-Hintergrund, da sie der humanen Erkrankung ähnliche diabetische Nierenschäden

entwickeln [23]. Eine Schwäche dieses Modells ist, dass es auf einem Gendefekt des Leptinrezeptors beruht, der beim Menschen nur sehr selten vorkommt und es daher fraglich ist, ob die Studienergebnisse ohne weiteres auf die menschliche Erkrankung übertragbar sind. Die Tiere können zudem nach einiger Zeit Adipositas-bedingt weniger Nahrung aufnehmen, so dass Gewicht und Insulinspiegel fallen und unter Umständen unspezifische Effekte auftreten. Der C57BLKS-Stamm ist darüberhinaus anfällig gegenüber Atherosklerose, was möglicherweise schwer quantifizierbare Nebeneffekte bewirkt [23].

Alle gängigen Mausmodelle des Diabetes mellitus ermöglichen die Untersuchung der frühen diabetischen Nierenschäden, sind jedoch zur Erforschung der molekularen Mechanismen, die zur Progression in späteren Stadien führen, weniger geeignet. Beim Menschen entwickelt sich die fortgeschrittene diabetische Nephropathie über Jahrzehnte und ist dann gekennzeichnet durch schwere globale Glomerulosklerose, reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, interstitielle Immunzellinfiltrate, Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose [17]. Die langsame Progression der Erkrankung macht es schwer, diese späten Stadien zu untersuchen, da die derzeit verfügbaren Tiermodelle in einem Zeitraum von sechs Monaten keine signifikanten tubulointerstitiellen Schäden zeigen [4]. Eine Beschleunigung der Progression im Tiermodell könnte in diesem Fall hilfreich sein. Wir wählten hierfür die Methode der Uninephrektomie, bei der durch Reduktion des Nierengewebes eine glomeruläre Hyperfiltration induziert wird [21, 78]. Für die diabetische Nephropathie erscheint diese Methode sinnvoll, da mit der glomerulären Hyperfiltration ein originärer pathophysiologischer Mechanismus der diabetischen Nephropathie verstärkt wird, ohne nicht diabetes-assoziierte Mechanismen zu beeinflussen. Wir konnten zeigen, dass die Uninephrektomie im Alter von 6 Wochen die Glomerulosklerose, die Tubulusatrophie und die tubulointerstitielle Fibrose verglichen mit den Sham-operierten Mäusen verstärkt. Damit assoziiert waren eine gesteigerte Infiltration von Makrophagen sowie verstärkte Expression profibrotischer Zytokine und Chemokine wie Tgf- β und Mcp-1. Levine et al. konnten die histopathologischen Ergebnisse kürzlich bestätigen [138], so dass die Uninephrektomie als valides Modell zur Beschleunigung der Progression einer diabetischen Nephropathie bei der db/db-Maus angesehen werden kann.

1988 vertrat Brenner die Hypothese, dass eine geringe Nephronzahl bei der Geburt mit späterem Bluthochdruck assoziiert ist [22]. Studien an Lebendnierenspendern zeigten bei einigen Patienten einen Blutdruckanstieg nach Nephrektomie [223]. Nach Uninephrektomie sollten die Tiere unserer Studie daher ebenfalls einen erhöhten Blutdruck zeigen. Die Messung des Blutdrucks wurde jedoch nicht durchgeführt. Die derzeit einzige Studie, bei der der Blutdruck bei der C57BLKS/J db/db-Maus gemessen wurde, konnte keine signifikante Hypertonie bei der db/db-Maus zeigen [130]. Zudem beziehen sich die Berichte über die Blutdrucksteigerung nach Nephrektomie auf Messungen am Menschen, die nicht ohne Weiteres auf die Maus übertragbar sind. Die fehlende Blutdruckmessung ist eine Schwäche der Studie, die zusätzliche Information hätte aber den erforderlichen Mehraufwand nicht gerechtfertigt.

Ein Vorteil der db/db-Maus ist die verlässliche und stabile Proteinurie, die bereits im Alter von 8 Wochen in einem Bereich von 68-303 µg/24h messbar ist [199]. Die gemessene Albuminurie unserer Studie bestätigt dies jedoch nicht. Die Albuminausscheidung steigt erst verspätet an und erreicht dann nicht das beschriebene Ausmaß. Während sich die Angaben in der Literatur meist auf einen 24-Stunden-Sammelurin, gewonnen in metabolischen Käfigen, bezieht, verwendeten wir Spontanurin. Die aus Spontanurin gemessenen Werte sind per se weniger reliabel und lassen sich zudem schlecht mit den Werten aus Sammelurin vergleichen. Die Proteinurie ist Ausdruck einer glomerulären Schädigung. Die in der Studie nachgewiesene Verbesserung der Glomerulosklerose in der Spiegelmer-behandelten Gruppe sollte daher auch mit einer Reduktion der Albuminurie im Vergleich zur Kontrollgruppe einhergehen, auch wenn die Albuminurie insgesamt gering ist. Die Albuminurie unterscheidet sich jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant. Bildet man die Albumin/Kreatinin-Ratio, um unterschiedliche Harnkonzentrationen im Spontanurin auszugleichen, zeigt sich, dass die Werte beider Gruppen innerhalb einer physiologischen Schwankungsbreite liegen und somit angenommen werden kann, dass die diabetischen Tiere überhaupt keine relevante Proteinurie entwickeln. Ein signifikanter Unterschied beider Gruppen wäre demnach nicht zu erwarten. Warum die Mäuse in der vorliegenden Studie keine Proteinurie entwickelt haben bleibt weiter unklar.

Die Hypothese unterstützend konnte die Studie zeigen, dass die Zahl glomerulärer und interstitieller Makrophagen durch 8-wöchige Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG, beginnend im Alter von vier Monaten, reduziert wird. Damit assoziiert war eine reduzierte renale Expression von Ccr2, dem Mcp-1-Rezeptor, was einen indirekten Marker renaler Makrophagen darstellt. Zudem konnte eine geringere Zahl proliferierender glomerulärer Zellen beobachtet werden, jedoch konnten direkte Effekte von mNOX-E36-3'PEG auf die Proliferation von Makrophagen und Mesangialzellen ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund ist die geringere Proliferation im glomerulären Kompartiment eher auf eine Reduktion der Makrophagen-abhängigen Proliferation von Mesangialzellen und der glomerulären Entzündung zurückzuführen [107].

Dieses Konzept wird unterstützt durch unsere Beobachtung, dass die glomeruläre Expression von Mcp-1 durch Behandlung mit mNOX-E36-3'PEG deutlich reduziert wird. Außerdem ist die geringere Zahl glomerulärer Makrophagen und glomerulärer proliferierender Zellen bei uninephrektomierten (1K) db/db-Mäusen, die mit mNOX-E36-3'PEG behandelt wurden, assoziiert mit dem Schutz vor globaler Glomerulosklerose. Die positiven Effekte von mNOX-E36-3'PEG auf die glomeruläre Pathologie und die GFR bei db/db-Mäusen sind vereinbar mit Studien, die andere Mcp-1-Antagonisten in anderen Modellen glomerulärer Schädigung testeten [68, 93, 141, 195, 208, 224]. Bemerkenswert ist, dass die späte Blockade von Mcp-1 auch die Zahl interstitieller Makrophagen reduziert, was mit geringerer tubulointerstitieller Schädigung bei db/db-Mäusen einhergeht.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass die Anwesenheit glomerulärer und interstitieller Makrophagen zur Nierenschädigung bei db/db-Mäusen beitragen, ein

Mechanismus, den man als „Entzündung“ bezeichnen könnte [70, 149, 154]. Makrophagen produzieren beispielsweise proinflammatorische Mediatoren wie etwa M_{cp}-1, zusätzlich zu den Mediatoren, die von renalen Zellen synthetisiert werden. Es handelt sich um einen Mechanismus der positiven Rückkopplung [30, 69]. Dieser bei nicht-diabetischen Nierenerkrankungen beobachtete Mechanismus kann wahrscheinlich aus zwei Gründen auf die diabetische Nephropathie beim Menschen übertragen werden: zum Einen ist die Infiltration von Makrophagen in das Interstitium häufig bei diabetischer Nephropathie [17] und zum zweiten scheiden Patienten mit diabetischer Nephropathie hohe Mengen M_{cp}-1 im Urin aus, was auf einen intrarenalen entzündlichen Prozess hindeutet [53, 155].

Die Expression von Chemokinen führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase C in Nierenzellen und Immunzellinfiltraten. Therapeutische Intervention, die auf die Proteinkinase C abzielen, können diesen positiven Rückkopplungsmechanismus durchbrechen, dadurch dass die Expression von Chemokinen, die Rekrutierung von Immunzellen und die tubuläre Schädigung sowohl im Tiermodell der diabetischen Nephropathie als auch bei Patienten mit diabetischer Nephropathie reduziert wird [121, 216]. Basierend auf diesen Daten wird eine entzündliche Komponente in der Progression der diabetischen Nephropathie immer wahrscheinlicher [215]. Dass diese experimentellen Daten für die menschliche Erkrankung wichtig sind wurde bestätigt durch Transkriptom-Analysen menschlicher Nierenbiopsien von Patienten mit diabetischer Nephropathie, die eine spezifische NF-kappaB-Promotor-abhängige entzündliche Stressantwort in der Progression der diabetischen Nephropathie identifizieren konnten [194].

5.2 Effekt der M_{cp}-1-Blockade bei COL4A3^{-/-}-Mäusen

Eine Vielzahl von Nierenerkrankungen geht einher mit der Infiltration von Makrophagen, die sowohl die glomeruläre als auch die tubulointerstitielle Schädigung vermitteln [59, 126, 226]. Über die Rolle von Makrophagen in der Krankheitsprogression des Alport-Syndroms ist derzeit jedoch wenig bekannt, jedoch legen insbesondere Daten aus anderen Krankheitsmodellen der chronischen Niereninsuffizienz eine pathogenetische Rolle des Chemokinsystems und der Makrophagen beim Alport-Syndrom nahe [46, 52, 197, 222].

Ninichuk et al. konnten zeigen, dass die Blockade des Chemokinrezeptors Ccr1 zu einer Reduktion der Makrophageninfiltrate im Tubulointerstitium führt, was mit verlängertem Überleben und geringerer tubulointerstitieller Nierenschädigung assoziiert war [162]. Vor dem Hintergrund dieser Daten stellt sich die Frage, ob die kombinierte Blockade tubulointerstitieller und glomerulärer Makrophagen darüber hinaus zusätzliche Effekte zeigt. Das Chemokin MCP-1 könnte hierbei ein passendes Ziel für eine pharmakologische Blockade darstellen, da es in der Niere die Rekrutierung von Makrophagen sowohl in das glomeruläre wie auch in das tubulointerstitielle Kompartiment vermittelt, etwa im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis [68, 141] oder der Lupusnephritis [93, 201]. Die Hypothese ist, dass durch die

Behandlung mit dem Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG die Zahl renaler Makrophagen bei COL4A3-defizienten Mäusen, einem experimentellen Modell des autosomal-rezessiven Alport-Syndroms, reduziert werden kann, was mit reduzierter Nierenschädigung und verlängertem Überleben assoziiert sein sollte.

Für die vorliegende Studie wurden Kollagen-IV- α_3 -defiziente Mäuse (COL4A3^{-/-}) im 129/SvJ-Hintergrund verwendet, ein Tiermodell für das autosomal-rezessive Alport-Syndrom, das aufgrund verschiedener Faktoren als besonders geeignet erschien [39]. In diesem Modell zeigt sich eine rasche Progression mit Einsetzen der Proteinurie und Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz innerhalb weniger Wochen, die Tiere weisen genetische und phänotypische Charakteristika der humanen Erkrankung auf und es stellt ein etabliertes und gängiges Modell des Alport-Syndroms dar [37]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind daher gut mit denen anderer Studien vergleichbar.

Dennoch stellt das Tiermodell eine mögliche Limitation der Studie dar. Es ist nicht bekannt, ob die Ergebnisse problemlos auf den Menschen übertragen werden können, zumal die Mehrheit der Patienten am X-chromosomalen Alport-Syndrom erkrankt ist. Für das X-chromosomale Alport-Syndrom konnte bereits eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachgewiesen werden [83]. Auch für das autosomal-rezessive Alport-Syndrom wurde ein Einfluss des Genotyps auf den Phänotyp gezeigt. COL4A3^{-/-}-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund erkranken später und zeigen eine langsamere Krankheitsprogression verglichen mit Tieren im 129/SvJ-Hintergrund [37]. Cosgrove et al. konnten ein unterschiedliches Ansprechen auf pharmakologische Intervention nachweisen [38]. Es ist daher durchaus möglich, dass auch Therapieeffekte mit dem Genotyp korrelieren, was die Übertragbarkeit möglicher Effekte von einem autosomal-rezessiven Mausmodell auf eine X-chromosomale Patientenpopulation erschwert.

Die rasche Krankheitsprogression des Tiermodells birgt das Risiko, dass die Erkrankung selbst bei früh begonnener pharmakologischer Intervention bereits zu weit fortgeschritten ist und damit der Therapiebeginn zu spät oder die Therapiedauer zu kurz ist, um einen Effekt zu beobachten. Gross et al. konnten zeigen, dass eine im Alter von vier Wochen begonnene Therapie mit dem ACE-Inhibitor Ramipril das Überleben Kollagen-defizienter Mäuse um mehr als 100 % verlängern konnte, während ein Therapiebeginn mit sieben Wochen keinen Einfluss auf das Überleben hatte [81]. In einer Studie von Zeisberg et al. konnte gezeigt werden, dass die Blockade von Matrix-Metalloproteinasen vor Einsetzen der Proteinurie protektiv wirkt, während ein später Therapiebeginn nach Einsetzen der Proteinurie die Progression beschleunigt [233]. Der Erfolg einer Behandlung des Alport-Syndroms hängt somit auch von der richtigen Wahl des Therapiebeginns bzw. der Therapiedauer ab. Mit der Behandlung der Kollagen-defizienten Mäuse wurde im Alter von sechs Wochen vor dem Einsetzen der Proteinurie begonnen. Nachdem jedoch kein Überlebensvorteil bei Therapiebeginn mit sechs Wochen gesehen worden war, wurde mit der Behandlung einer weiteren Kohorte im Alter von drei Wochen begonnen. Es zeigte sich jedoch bei keinem der Tiere ein verlängertes Überleben,

so dass ein Effekt der früh begonnenen Therapie unwahrscheinlich erschien und daher aus Gründen des Tierschutzes auf eine Ausweitung dieser Kohorte verzichtet wurde.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Blockade von Mcp-1 durch mNOX-E36-3'PEG die Rekrutierung von Makrophagen in alle Nierenkompartimente signifikant blockiert. Jedoch war die Reduktion der glomerulären Makrophagen um 50 % und der interstitiellen Makrophagen um 30 % weder mit einer entsprechenden Verbesserung der Nierenschädigung noch mit einer Verlängerung des Überlebens assoziiert. Diese Diskrepanz überrascht, da die Anzahl glomerulärer und tubulointerstitieller Makrophagen gewöhnlich mit dem Ausmaß der Nierenpathologie korrelieren [59, 168, 197].

Eine mögliche Erklärung stellt die insgesamt geringe Anzahl an Makrophagen in der Niere Kollagen-defizienter Mäuse dar. Im Modell der Lupusnephritis finden sich bei unbehandelten Tieren im Glomerulus etwa um den Faktor 10, im Tubulointerstitium immerhin um den Faktor 2 höhere Makrophagenzahlen [132]. Auch in der Studie von Ninichuk et al., in der bei COL4A3^{-/-}-Mäusen durch Blockade von Ccr1 eine Reduktion der tubulointerstitiellen Makrophagen und damit eine Überlebensverlängerung bei geringerer Nierenschädigung erreicht wurde, konnten im Tubulointerstitium unbehandelter Mäuse doppelt so viele Makrophagen gezählt werden wie in der vorliegenden Studie [162].

Möglicherweise beeinflussen Makrophagen die Progression des Alport-Syndroms in unterschiedlicher Weise, abhängig davon, in welches Kompartiment sie rekrutiert wurden. Demnach vermitteln tubulointerstitielle Makrophagen die Entstehung einer tubulointerstitiellen Fibrose und tragen so zur Progression bei, während glomeruläre Makrophagen keinen Einfluss auf die glomeruläre Schädigung ausüben. Diese Vorstellung wird unterstützt durch eine kürzlich erschienene Studie zur Rolle der Lymphozyten beim Alport-Syndrom [134]. LeBleu et al. konnten durch Studien an Knockout-Mäusen zeigen, dass durch Blockade einer Lymphozyteninfiltration die tubulointerstitielle Schädigung reduziert werden kann, während die glomeruläre Schädigung und das Überleben der Tiere unverändert bleiben [134]. Glomeruläre Makrophagen bei Kollagen-defizienten Mäusen könnten demnach auf ein geringes Maß an unspezifischer Entzündung hindeuten, die mit dem Alport-Syndrom assoziiert ist.

Eine weitere Erklärung könnte der Phänotyp bzw. der Aktivierungszustand der Makrophagen sein. Chemokine tragen zur phänotypischen Differenzierung und zur Aktivierung von Gewebsmakrophagen bei und könnten die Rekrutierung einer spezifischen Subpopulation unterstützen [145]. In einem Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis führte die Applikation der Ccr5-Antagonisten Met-Rantes und Apo-Rantes zu einer Verschlechterung der Nierenpathologie, obwohl die Rekrutierung von glomerulären Makrophagen blockiert wurde [9]. Es stellte sich heraus, dass diese Antagonisten spezifisch die Rekrutierung Makrophagen des M2-Phänotyps blockierten, die antiinflammatorisch, immunsuppressiv und regulatorisch wirken, während die Population der proinflammatorischen M1-Makrophagen unbeeinflusst

blieb [9, 145]. Derartige Effekte wurden in einer früheren Studie mit dem Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG nicht beobachtet und können daher ausgeschlossen werden [132].

5.3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Blockade von Mcp-1 mit Spiegelmeren kann die Rekrutierung von Makrophagen in das glomeruläre und tubulointerstitielle Kompartiment der Niere blockieren, die renale Schädigung reduzieren und die Nierenfunktion verbessern. Die Wirksamkeit des anti-Mcp-1-Spiegelmers mNOX-E36-3'PEG konnte für die uninephrektomierte db/db-Maus, einem Modell der diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden. Auch bei Blockade im späten Erkrankungsstadium erwies sich der Antagonist als wirksam. Auch bei der COL4A3^{-/-}-Maus, einem Modell des autosomal-rezessiven Alport-Syndroms konnte nachgewiesen werden, dass das anti-Mcp-1-Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG die Rekrutierung von Makrophagen in die Niere effektiv blockiert. Jedoch beeinflusste diese Blockade weder die Nierenpathologie noch das Überleben der Tiere.

Die weiter steigenden Zahlen chronisch niereninsuffizienter Patienten machen die Etablierung neuer Therapieansätze erforderlich. Die zunehmenden Hinweise auf eine Beteiligung entzündlicher Mechanismen an der Progression der chronischen Niereninsuffizienz zeigen einen bisher nicht therapierten Mechanismus. Mit der vorliegenden Studie konnte ein neues therapeutisches Zielmolekül identifiziert und dessen Blockade als mögliche Therapie bei der häufigsten Ursache der chronischen Niereninsuffizienz, der diabetischen Nephropathie dargestellt werden. Beim Alport-Syndrom konnte diese Blockade die Progression nicht beeinflussen, so dass der Beitrag eines entzündlichen Mechanismus weiterhin fraglich bleibt und die Blockade von Mcp-1 derzeit kein therapeutisches Ziel darstellt.

Trotz gegebener Limitationen, legitimieren die vorliegenden Daten die weitere Untersuchung der therapeutischen Blockade von Mcp-1 und die Evaluation ihres Einsatzes beim Menschen als zusätzlichen Therapieansatz bei der diabetischen Nephropathie und möglicherweise bei anderen nicht-hereditären Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz.

6 Quellenverzeichnis

- [1] Abrahamson, D.R., et al., *Laminin-1 reexpression in Alport mouse glomerular basement membranes*. Kidney Int, 2003. 63(3): p. 826-34.
- [2] Adler, A.I., et al., *Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)*. Kidney Int, 2003. 63(1): p. 225-32.
- [3] Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. 15(7): p. 539-53.
- [4] Allen, T.J., M.E. Cooper, and H.Y. Lan, *Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy*. Curr Diab Rep, 2004. 4(6): p. 435-40.
- [5] Alport, A., *Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis*. Br Med J, 1927. 1(1): p. 504-506.
- [6] Amos, A.F., D.J. McCarty, and P. Zimmet, *The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010*. Diabet Med, 1997. 14 Suppl 5: p. S1-85.
- [7] Ancuta, P., et al., *Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes*. J Exp Med, 2003. 197(12): p. 1701-7.
- [8] Anders, H.J., *[Chronic kidney disease]*. Med Klin (Munich), 2005. 100(11): p. 714-21.
- [9] Anders, H.J., et al., *CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration*. J Immunol, 2003. 170(11): p. 5658-66.
- [10] Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. Kidney Int, 2003. 63(2): p. 401-15.
- [11] Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic*. Nature, 1998. 392(6676): p. 565-8.
- [12] Barnett, A.H., et al., *Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2004. 351(19): p. 1952-61.
- [13] Becskei, C., et al., *The anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11-3 blocks ghrelin- but not fasting-induced neuronal activation in the hypothalamic arcuate nucleus*. J Neuroendocrinol, 2008. 20(1): p. 85-92.
- [14] Best, C.J. and M.R. Emmert-Buck, *Molecular profiling of tissue samples using laser capture microdissection*. Expert Rev Mol Diagn, 2001. 1(1): p. 53-60.
- [15] Bilik, K.U., et al., *In-vitro and in-vivo antagonistic action of an anti-amylin Spiegelmer*. Neuroreport, 2007. 18(17): p. 1855-9.
- [16] Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. 382(6594): p. 829-33.
- [17] Bohle, A., et al., *The pathogenesis of chronic renal failure in diabetic nephropathy. Investigation of 488 cases of diabetic glomerulosclerosis*. Pathol Res Pract, 1991. 187(2-3): p. 251-9.
- [18] Bohm, M., et al., *Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue*. Am J Pathol, 1997. 151(1): p. 63-7.
- [19] Bonner, R.F., et al., *Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue*. Science, 1997. 278(5342): p. 1481,1483.
- [20] Borza, D.B., et al., *The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes*. J Biol Chem, 2001. 276(30): p. 28532-40.
- [21] Bower, G., et al., *Studies of the glomerular mesangium and the juxtaglomerular apparatus in the genetically diabetic mouse*. Lab Invest, 1980. 43(4): p. 333-41.

- [22] Brenner, B.M., D.L. Garcia, and S. Anderson, *Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other?* Am J Hypertens, 1988. 1(4 Pt 1): p. 335-47.
- [23] Breyer, M.D., et al., *Mouse models of diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2005. 16(1): p. 27-45.
- [24] Cangiotti, A.M., et al., *Evolution of glomerular basement membrane lesions in a male patient with Alport syndrome: ultrastructural and morphometric study.* Nephrol Dial Transplant, 1996. 11(9): p. 1829-34.
- [25] Carmines, P.K., K. Ohishi, and H. Ikenaga, *Functional impairment of renal afferent arteriolar voltage-gated calcium channels in rats with diabetes mellitus.* J Clin Invest, 1996. 98(11): p. 2564-71.
- [26] Chavakis, T., et al., *The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment.* J Exp Med, 2003. 198(10): p. 1507-15.
- [27] Chow, F., et al., *Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury.* Kidney Int, 2004. 65(1): p. 116-28.
- [28] Chow, F.Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice.* Diabetologia, 2007. 50(2): p. 471-80.
- [29] Chow, F.Y., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice.* Kidney Int, 2006. 69(1): p. 73-80.
- [30] Chow, F.Y., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice.* J Am Soc Nephrol, 2005. 16(6): p. 1711-22.
- [31] Chute, J.P., *Stem cell homing.* Curr Opin Hematol, 2006. 13(6): p. 399-406.
- [32] Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.* Science, 1995. 270(5243): p. 1811-5.
- [33] Cohen, C.D., et al., *Laser microdissection and gene expression analysis on formaldehyde-fixed archival tissue.* Kidney Int, 2002. 61(1): p. 125-32.
- [34] Conn, G.L. and D.E. Draper, *RNA structure.* Curr Opin Struct Biol, 1998. 8(3): p. 278-85.
- [35] Cooper, M.E., *Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy.* Lancet, 1998. 352(9123): p. 213-9.
- [36] Cooper, M.E., P. Mundel, and G. Boner, *Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy.* Semin Nephrol, 2002. 22(5): p. 393-8.
- [37] Cosgrove, D., et al., *Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis.* Kidney Int, 2007. 71(7): p. 615-8.
- [38] Cosgrove, D., et al., *Integrin alpha1beta1 regulates matrix metalloproteinases via P38 mitogen-activated protein kinase in mesangial cells: implications for Alport syndrome.* Am J Pathol, 2008. 172(3): p. 761-73.
- [39] Cosgrove, D., et al., *Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome.* Genes Dev, 1996. 10(23): p. 2981-92.
- [40] Cosgrove, D., et al., *Integrin alpha1beta1 and transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy.* Am J Pathol, 2000. 157(5): p. 1649-59.
- [41] Cosgrove, D., et al., *Ultrastructural, physiological, and molecular defects in the inner ear of a gene-knockout mouse model for autosomal Alport syndrome.* Hear Res, 1998. 121(1-2): p. 84-98.
- [42] Denekas, T., et al., *Inhibition of stimulated meningeal blood flow by a calcitonin gene-related peptide binding mirror-image RNA oligonucleotide.* Br J Pharmacol, 2006. 148(4): p. 536-43.
- [43] Diamond, J.R., S.D. Ricardo, and S. Klahr, *Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy.* Semin Nephrol, 1998. 18(6): p. 594-602.

- [44] Drolet, D.W., et al., *Pharmacokinetics and safety of an anti-vascular endothelial growth factor aptamer (NX1838) following injection into the vitreous humor of rhesus monkeys*. Pharm Res, 2000. 17(12): p. 1503-10.
- [45] Durvasula, R.V., et al., *Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain*. Kidney Int, 2004. 65(1): p. 30-9.
- [46] Eardley, K.S., et al., *The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. 74(4): p. 495-504.
- [47] Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. 346(6287): p. 818-22.
- [48] Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures*. Nature, 1992. 355(6363): p. 850-2.
- [49] Emmert-Buck, M.R., et al., *Laser capture microdissection*. Science, 1996. 274(5289): p. 998-1001.
- [50] Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes*. Biochim Biophys Acta, 1971. 251(3): p. 427-34.
- [51] Engvall, E. and P. Perlman, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. 8(9): p. 871-4.
- [52] Erwig, L.P., *Macrophages and hypoxia in human chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. 74(4): p. 405-6.
- [53] Erwig, L.P., D.C. Kluth, and A.J. Rees, *Macrophage heterogeneity in renal inflammation*. Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(10): p. 1962-5.
- [54] Eulberg, D., et al., *Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist*. Nucleic Acids Res, 2005. 33(4): p. e45.
- [55] Eulberg, D., et. al., *Spiegelmers for Therapeutic Applications - Use of Chiral Principles in Evolutionary Selection Techniques*. In: Klussmann, S. [editor]. The Aptamer Handbook, 2006: p. 417-442.
- [56] Eyetech-Study-Group, *Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration*. Retina, 2002. 22(2): p. 143-52.
- [57] Faulhammer, D., et al., *Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ*. Rna, 2004. 10(3): p. 516-27.
- [58] Fend, F. and M. Raffeld, *Laser capture microdissection in pathology*. J Clin Pathol, 2000. 53(9): p. 666-72.
- [59] Ferenbach, D., D.C. Kluth, and J. Hughes, *Inflammatory cells in renal injury and repair*. Semin Nephrol, 2007. 27(3): p. 250-9.
- [60] Flinter, F.A., et al., *Genetics of classic Alport's syndrome*. Lancet, 1988. 2(8618): p. 1005-7.
- [61] Floege, J., et al., *Bone marrow transplantation rescues Alport mice*. Nephrol Dial Transplant, 2006. 21(10): p. 2721-3.
- [62] Flyvbjerg, A., *Putative pathophysiological role of growth factors and cytokines in experimental diabetic kidney disease*. Diabetologia, 2000. 43(10): p. 1205-23.
- [63] Fogo, A., *Diabetic Nephropathy*. in: Atlas of Renal Pathology, http://www2.us.elsevierhealth.com/ajkd/atlas/34/5/atlas34_5.htm.
- [64] Fogo, A.B., *Mechanisms of progression of chronic kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2007. 22(12): p. 2011-22.
- [65] Forbes, J.M., et al., *Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(8 Suppl 3): p. S254-8.
- [66] Frei, U., Schober-Halstenberg, H.-J., *Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2005/2006, Berlin*.

- [67] Friedman E., *Diabetic Nephropathy: Impact of Comorbidity*. in: Atlas of diseases of the kidney, Schrier R. [Hrsg.], 1999.
- [68] Fujinaka, H., et al., *Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats*. J Am Soc Nephrol, 1997. 8(7): p. 1174-8.
- [69] Furuta, T., et al., *The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis*. Am J Kidney Dis, 1993. 21(5): p. 480-5.
- [70] Galkina, E. and K. Ley, *Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2006. 17(2): p. 368-77.
- [71] Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 108-15.
- [72] Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. 351(13): p. 1296-305.
- [73] Goring, H.U., M. Homann, and M. Lörger, *In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules*. Int J Parasitol, 2003. 33(12): p. 1309-17.
- [74] Gragoudas, E.S., et al., *Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2004. 351(27): p. 2805-16.
- [75] Grandaliano, G., et al., *Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment*. J Am Soc Nephrol, 1996. 7(6): p. 906-13.
- [76] Gregory, M.C., et al., *Alport syndrome--clinical phenotypes, incidence, and pathology*. Contrib Nephrol, 1996. 117: p. 1-28.
- [77] Griffin, L.C., et al., *In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits*. Blood, 1993. 81(12): p. 3271-6.
- [78] Gross, M.L., K. Amann, and E. Ritz, *Nephron number and renal risk in hypertension and diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16 Suppl 1: p. S27-9.
- [79] Gross, O., *Alport-Syndrom und familiäre benigne Hämaturie*. Nieren- und Hochdruckkrankheiten, 2004. 33(7): p. 348-356.
- [80] Gross, O., et al., *DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria*. Kidney Int, 2004. 66(1): p. 102-11.
- [81] Gross, O., et al., *Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome*. Kidney Int, 2003. 63(2): p. 438-46.
- [82] Gross, O., et al., *Nephroprotection by antifibrotic and anti-inflammatory effects of the vasopeptidase inhibitor AVE7688*. Kidney Int, 2005. 68(2): p. 456-63.
- [83] Gross, O., et al., *Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling*. Nephrol Dial Transplant, 2002. 17(7): p. 1218-27.
- [84] Gross, O., et al., *Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome*. Nephrol Dial Transplant, 2003. 18(6): p. 1122-7.
- [85] Gross, O., et al., *Antifibrotic, nephroprotective potential of ACE inhibitor vs AT1 antagonist in a murine model of renal fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2004. 19(7): p. 1716-23.
- [86] Gross, O. and M. Weber, *[From the molecular genetics of Alport's syndrome to principles of organo-protection in chronic renal diseases]*. Med Klin (Munich), 2005. 100(12): p. 826-31.
- [87] Grunfeld, J.P., *The clinical spectrum of hereditary nephritis*. Kidney Int, 1985. 27(1): p. 83-92.
- [88] Grunfeld, J.P., et al., *Renal prognosis in women with hereditary nephritis*. Clin Nephrol, 1985. 23(6): p. 267-71.

- [89] Gubler, M.C., *Inherited diseases of the glomerular basement membrane*. Nat Clin Pract Nephrol, 2008. 4(1): p. 24-37.
- [90] Hahm, K., et al., *Alphav beta6 integrin regulates renal fibrosis and inflammation in Alport mouse*. Am J Pathol, 2007. 170(1): p. 110-25.
- [91] Haringman, J.J., et al., *A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. 54(8): p. 2387-92.
- [92] Harvey, S.J., et al., *Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function*. Kidney Int, 1998. 54(6): p. 1857-66.
- [93] Hasegawa, H., et al., *Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice*. Arthritis Rheum, 2003. 48(9): p. 2555-66.
- [94] Heikkila, P., K. Tryggvason, and P. Thorner, *Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy*. Exp Nephrol, 2000. 8(1): p. 1-7.
- [95] Helmling, S., et al., *Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(36): p. 13174-9.
- [96] Hood, J.C., et al., *A novel model of autosomal dominant Alport syndrome in Dalmatian dogs*. Nephrol Dial Transplant, 2002. 17(12): p. 2094-8.
- [97] Hood, J.C., et al., *Bull terrier hereditary nephritis: a model for autosomal dominant Alport syndrome*. Kidney Int, 1995. 47(3): p. 758-65.
- [98] Horuk, R., et al., *A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor*. Science, 1993. 261(5125): p. 1182-4.
- [99] Hostikka, S.L., et al., *Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(4): p. 1606-10.
- [100] Hostikka, S.L. and K. Tryggvason, *The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagen and comparison with the alpha 1(IV) chain*. J Biol Chem, 1988. 263(36): p. 19488-93.
- [101] Hovind, P., et al., *Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study*. Bmj, 2004. 328(7448): p. 1105.
- [102] Hsu, C.Y., C.E. McCulloch, and G.C. Curhan, *Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency among adults in the United States: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. J Am Soc Nephrol, 2002. 13(2): p. 504-10.
- [103] Huang, X.R., et al., *Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(7): p. 1738-47.
- [104] Hudson, B.G., S.T. Reeders, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. J Biol Chem, 1993. 268(35): p. 26033-6.
- [105] Hudson, B.G., et al., *Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. N Engl J Med, 2003. 348(25): p. 2543-56.
- [106] Hummel, K.P., M.M. Dickie, and D.L. Coleman, *Diabetes, a new mutation in the mouse*. Science, 1966. 153(740): p. 1127-8.
- [107] Ikezumi, Y., et al., *Adoptive transfer studies demonstrate that macrophages can induce proteinuria and mesangial cell proliferation*. Kidney Int, 2003. 63(1): p. 83-95.
- [108] Jafar, T.H., et al., *Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis*. Ann Intern Med, 2003. 139(4): p. 244-52.
- [109] Jais, J.P., et al., *X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community*

- Alport Syndrome Concerted Action" study.* J Am Soc Nephrol, 2003. 14(10): p. 2603-10.
- [110] Jais, J.P., et al., *X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males.* J Am Soc Nephrol, 2000. 11(4): p. 649-57.
 - [111] Johnston, B. and E.C. Butcher, *Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration.* Semin Immunol, 2002. 14(2): p. 83-92.
 - [112] K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, c., and stratification, http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p1_exec.htm.
 - [113] Kalluri, R., V.H. Gattone, 2nd, and B.G. Hudson, *Identification and localization of type IV collagen chains in the inner ear cochlea.* Connect Tissue Res, 1998. 37(1-2): p. 143-50.
 - [114] Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.* J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1776-84.
 - [115] Kalluri, R., et al., *Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis.* J Clin Invest, 1997. 99(10): p. 2470-8.
 - [116] Kanamori, H., et al., *Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy.* Biochem Biophys Res Commun, 2007. 360(4): p. 772-7.
 - [117] Kashtan, C.E., *Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease.* J Am Soc Nephrol, 1998. 9(9): p. 1736-50.
 - [118] Kashtan, C.E., *Animal models of Alport syndrome.* Nephrol Dial Transplant, 2002. 17(8): p. 1359-62.
 - [119] Kashtan, C.E., *Renal transplantation in patients with Alport syndrome.* Pediatr Transplant, 2006. 10(6): p. 651-7.
 - [120] Kashtan, C.E. and A.F. Michael, *Alport syndrome.* Kidney Int, 1996. 50(5): p. 1445-63.
 - [121] Kelly, D.J., et al., *Protein kinase C β inhibition attenuates osteopontin expression, macrophage recruitment, and tubulointerstitial injury in advanced experimental diabetic nephropathy.* J Am Soc Nephrol, 2005. 16(6): p. 1654-60.
 - [122] Kikuchi, Y., et al., *Fractalkine and its receptor, CX3CR1, upregulation in streptozotocin-induced diabetic kidneys.* Nephron Exp Nephrol, 2004. 97(1): p. e17-25.
 - [123] Kimmelstiel P., W.C., *Intercapillary lesions in glomeruli of the kidney.* Am J Pathol, 1936. 12(1).
 - [124] King, H., R.E. Aubert, and W.H. Herman, *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections.* Diabetes Care, 1998. 21(9): p. 1414-31.
 - [125] Kitagawa, K., et al., *Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney.* Am J Pathol, 2004. 165(1): p. 237-46.
 - [126] Kitching, A.R., S.R. Holdsworth, and M.J. Hickey, *Targeting leukocytes in immune glomerular diseases.* Curr Med Chem, 2008. 15(5): p. 448-58.
 - [127] Klussmann, S., et al., *Mirror-image RNA that binds D-adenosine.* Nat Biotechnol, 1996. 14(9): p. 1112-5.
 - [128] Kobelt, P., et al., *Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats.* Gut, 2006. 55(6): p. 788-92.
 - [129] Koepke, M.L., et al., *Nephroprotective effect of the HMG-CoA-reductase inhibitor cerivastatin in a mouse model of progressive renal fibrosis in Alport syndrome.* Nephrol Dial Transplant, 2007. 22(4): p. 1062-9.
 - [130] Koya, D., et al., *Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC β inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes.* Faseb J, 2000. 14(3): p. 439-47.
 - [131] Kulkarni, O. and H.J. Anders, *[CCL2/MCP1: a novel target in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis.].* Z Rheumatol, 2008.
 - [132] Kulkarni, O., et al., *Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice.* J Am Soc Nephrol, 2007. 18(8): p. 2350-8.

- [133] Langston, R.D., et al., *Renal insufficiency and anemia are independent risk factors for death among patients with acute myocardial infarction*. *Kidney Int*, 2003. 64(4): p. 1398-405.
- [134] Lebleu, V.S., et al., *Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease*. *Lab Invest*, 2008. 88(3): p. 284-92.
- [135] Lederer, E. and R. Ouseph, *Chronic kidney disease*. *Am J Kidney Dis*, 2007. 49(1): p. 162-71.
- [136] Leinonen, A., et al., *Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains*. *J Biol Chem*, 1994. 269(42): p. 26172-7.
- [137] Levey, A.S., et al., *Dietary protein restriction and the progression of chronic renal disease: what have all of the results of the MDRD study shown? Modification of Diet in Renal Disease Study group*. *J Am Soc Nephrol*, 1999. 10(11): p. 2426-39.
- [138] Levine, D.Z., M. Iacovitti, and S.J. Robertson, *Modulation of single-nephron GFR in the db/db mouse model of type 2 diabetes mellitus. II. Effects of renal mass reduction*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. 294(6): p. R1840-6.
- [139] Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(9): p. 678-89.
- [140] Li, J.H., et al., *Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway*. *Am J Pathol*, 2004. 164(4): p. 1389-97.
- [141] Lloyd, C.M., et al., *RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis*. *J Exp Med*, 1997. 185(7): p. 1371-80.
- [142] Lu, W., et al., *Insertional mutation of the collagen genes Col4a3 and Col4a4 in a mouse model of Alport syndrome*. *Genomics*, 1999. 61(2): p. 113-24.
- [143] Lubkowski, J., et al., *The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions*. *Nat Struct Biol*, 1997. 4(1): p. 64-9.
- [144] Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. *N Engl J Med*, 1998. 338(7): p. 436-45.
- [145] Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. 25(12): p. 677-86.
- [146] Mariyama, M., et al., *Complete primary structure of the human alpha 3(IV) collagen chain. Coexpression of the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen chains in human tissues*. *J Biol Chem*, 1994. 269(37): p. 23013-7.
- [147] Mazzucco, G., et al., *Ultrastructural and immunohistochemical findings in Alport's syndrome: a study of 108 patients from 97 Italian families with particular emphasis on COL4A5 gene mutation correlations*. *J Am Soc Nephrol*, 1998. 9(6): p. 1023-31.
- [148] Mehrad, B., M.P. Keane, and R.M. Strieter, *Chemokines as mediators of angiogenesis*. *Thromb Haemost*, 2007. 97(5): p. 755-62.
- [149] Meyer, T.W., *Immunosuppression for diabetic glomerular disease?* *Kidney Int*, 2003. 63(1): p. 377-8.
- [150] Mezzano, S.A., M. Ruiz-Ortega, and J. Egido, *Angiotensin II and renal fibrosis*. *Hypertension*, 2001. 38(3 Pt 2): p. 635-8.
- [151] Miner, J.H. and J.R. Sanes, *Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches*. *J Cell Biol*, 1994. 127(3): p. 879-91.
- [152] Mogensen, C.E. and M.J. Andersen, *Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes*. *Diabetes*, 1973. 22(9): p. 706-12.
- [153] Mogensen, C.E., C.K. Christensen, and E. Vittinghus, *The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 1983. 32 Suppl 2: p. 64-78.

- [154] Mora, C. and J.F. Navarro, *The role of inflammation as a pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes*. Curr Diab Rep, 2005. 5(6): p. 399-401.
- [155] Morii, T., et al., *Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy*. J Diabetes Complications, 2003. 17(1): p. 11-5.
- [156] Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. 2(2): p. 123-8.
- [157] Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. 52(1): p. 145-76.
- [158] Myers, J.C., et al., *Molecular cloning of alpha 5(IV) collagen and assignment of the gene to the region of the X chromosome containing the Alport syndrome locus*. Am J Hum Genet, 1990. 46(6): p. 1024-33.
- [159] Neote, K., et al., *Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor*. Blood, 1994. 84(1): p. 44-52.
- [160] Nervi, B., D.C. Link, and J.F. DiPersio, *Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization*. J Cell Biochem, 2006. 99(3): p. 690-705.
- [161] Nikolic-Paterson, D.J. and R.C. Atkins, *The role of macrophages in glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2001. 16 Suppl 5: p. 3-7.
- [162] Ninichuk, V., et al., *Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(4): p. 977-85.
- [163] Ninichuk, V., et al., *The role of interstitial macrophages in nephropathy of type 2 diabetic db/db mice*. Am J Pathol, 2007. 170(4): p. 1267-76.
- [164] Ninomiya, Y., et al., *Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies*. J Cell Biol, 1995. 130(5): p. 1219-29.
- [165] Nolte, A., et al., *Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine*. Nat Biotechnol, 1996. 14(9): p. 1116-9.
- [166] Oohashi, T., et al., *Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5*. J Biol Chem, 1994. 269(10): p. 7520-6.
- [167] Osterby, R., *Renal changes in the diabetic kidney*. Nephrol Dial Transplant, 1997. 12(6): p. 1282-3.
- [168] Panzer, U., et al., *Kidney diseases and chemokines*. Curr Drug Targets, 2006. 7(1): p. 65-80.
- [169] Paolini, J.F., et al., *The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations*. J Immunol, 1994. 153(6): p. 2704-17.
- [170] Parish, C.R., *The role of heparan sulphate in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(9): p. 633-43.
- [171] Patel, A., et al., *Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2008. 358(24): p. 2560-72.
- [172] Peissel, B., et al., *Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients*. J Clin Invest, 1995. 96(4): p. 1948-57.
- [173] Pirson, Y., *Making the diagnosis of Alport's syndrome*. Kidney Int, 1999. 56(2): p. 760-75.
- [174] Puck, J.M. and H.F. Willard, *X inactivation in females with X-linked disease*. N Engl J Med, 1998. 338(5): p. 325-8.
- [175] Purschke, W.G., et al., *An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(13): p. 5173-8.
- [176] Qi, Z., et al., *Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. 286(3): p. F590-6.

- [177] Rao, V.H., et al., *Dysregulation of renal MMP-3 and MMP-7 in canine X-linked Alport syndrome*. *Pediatr Nephrol*, 2005. 20(6): p. 732-9.
- [178] Rao, V.H., et al., *Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS)*. *Kidney Int*, 2003. 63(5): p. 1736-48.
- [179] Rao, V.H., et al., *Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with alport syndrome*. *Am J Pathol*, 2006. 169(1): p. 32-46.
- [180] Ritz, E. and D.C. Tarng, *Renal disease in type 2 diabetes*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. 16 Suppl 5: p. 11-8.
- [181] Rollins, B.J., *Chemokines*. *Blood*, 1997. 90(3): p. 909-28.
- [182] Rops, A.L., et al., *Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation*. *Kidney Int*, 2004. 65(3): p. 768-85.
- [183] Ruiz-Ortega, M., et al., *Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis*. *J Immunol*, 1998. 161(1): p. 430-9.
- [184] Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, and J. Egido, *Angiotensin III increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells*. *Kidney Int*, 2000. 57(6): p. 2285-98.
- [185] Ruiz-Ortega, M., et al., *Proinflammatory actions of angiotensins*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001. 10(3): p. 321-9.
- [186] Ruperez, M., et al., *Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney*. *Am J Pathol*, 2003. 163(5): p. 1937-47.
- [187] Ruster, C. and G. Wolf, *Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. 17(11): p. 2985-91.
- [188] Ruster, C. and G. Wolf, *The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy*. *Front Biosci*, 2008. 13: p. 944-55.
- [189] Samson, M., et al., *Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene*. *Nature*, 1996. 382(6593): p. 722-5.
- [190] Sassy-Prigent, C., et al., *Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Diabetes*, 2000. 49(3): p. 466-75.
- [191] Satriano, J.A., et al., *Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells*. *J Am Soc Nephrol*, 1997. 8(4): p. 596-603.
- [192] Sayers, R., et al., *Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression*. *Kidney Int*, 1999. 56(5): p. 1662-73.
- [193] Schifffl, H., S.M. Lang, and R. Fischer, *Stopping smoking slows accelerated progression of renal failure in primary renal disease*. *J Nephrol*, 2002. 15(3): p. 270-4.
- [194] Schmid, H., et al., *Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2006. 55(11): p. 2993-3003.
- [195] Schneider, A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta*. *Kidney Int*, 1999. 56(1): p. 135-44.
- [196] Schutze, K. and G. Lahr, *Identification of expressed genes by laser-mediated manipulation of single cells*. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(8): p. 737-42.
- [197] Sean Eardley, K. and P. Cockwell, *Macrophages and progressive tubulointerstitial disease*. *Kidney Int*, 2005. 68(2): p. 437-55.
- [198] Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11(1): p. 152-76.
- [199] Sharma, K., P. McCue, and S.R. Dunn, *Diabetic kidney disease in the db/db mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 284(6): p. F1138-44.

- [200] Shearman, L.P., et al., *Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice*. *Endocrinology*, 2006. 147(3): p. 1517-26.
- [201] Shimizu, S., et al., *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice*. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. 43(9): p. 1121-8.
- [202] Simone, N.L., et al., *Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis*. *Trends Genet*, 1998. 14(7): p. 272-6.
- [203] Smith, J.M., et al., *Contributions of the Transplant Registry: The 2006 Annual Report of the North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies (NAPRTCS)*. *Pediatr Transplant*, 2007. 11(4): p. 366-73.
- [204] Soininen, R., et al., *Complete primary structure of the alpha 1-chain of human basement membrane (type IV) collagen*. *FEBS Lett*, 1987. 225(1-2): p. 188-94.
- [205] Stoltenburg, R., C. Reinemann, and B. Strehlitz, *SELEX-A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. *Biomol Eng*, 2007. 24(4): p. 381-403.
- [206] Sugimoto, H., et al., *Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(19): p. 7321-6.
- [207] Takebayashi, K., et al., *Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients*. *J Diabetes Complications*, 2006. 20(2): p. 98-104.
- [208] Tang, W.W., M. Qi, and J.S. Warren, *Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN*. *Kidney Int*, 1996. 50(2): p. 665-71.
- [209] Taniguchi, H., et al., *Involvement of MCP-1 in tubulointerstitial fibrosis through massive proteinuria in anti-GBM nephritis induced in WKY rats*. *J Clin Immunol*, 2007. 27(4): p. 409-29.
- [210] Tashiro, K., et al., *Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy*. *J Clin Lab Anal*, 2002. 16(1): p. 1-4.
- [211] Tesch, G.H., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis*. *J Clin Invest*, 1999. 103(1): p. 73-80.
- [212] Thorner, P.S., *Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy*. *Nephron Clin Pract*, 2007. 106(2): p. c82-8.
- [213] Tryggvason, K., et al., *Can Alport syndrome be treated by gene therapy?* *Kidney Int*, 1997. 51(5): p. 1493-9.
- [214] Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. *Science*, 1990. 249(4968): p. 505-10.
- [215] Tuttle, K.R., *Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. 16(6): p. 1537-8.
- [216] Tuttle, K.R., et al., *The effect of ruboxistaurin on nephropathy in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2005. 28(11): p. 2686-90.
- [217] Utimura, R., et al., *Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes*. *Kidney Int*, 2003. 63(1): p. 209-16.
- [218] Valente, A.J., et al., *Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture*. *Biochemistry*, 1988. 27(11): p. 4162-8.
- [219] Viola, A. and A.D. Luster, *Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. 48: p. 171-97.
- [220] Vollhardt K., e.a., *Organische Chemie*. 2005.
- [221] Wada, T., et al., *Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 2000. 58(4): p. 1492-9.
- [222] Wang, Y., et al., *Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease*. *Kidney Int*, 2007. 72(3): p. 290-9.

- [223] Watnick, T.J., et al., *Microalbuminuria and hypertension in long-term renal donors*. Transplantation, 1988. 45(1): p. 59-65.
- [224] Wenzel, U., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis*. Kidney Int, 1997. 51(3): p. 770-6.
- [225] White, R.H., et al., *The Alport nephropathy: clinicopathological correlations*. Pediatr Nephrol, 2005. 20(7): p. 897-903.
- [226] Wilson, H.M., D. Walbaum, and A.J. Rees, *Macrophages and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. 13(3): p. 285-90.
- [227] Wlotzka, B., et al., *In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(13): p. 8898-902.
- [228] Wolf, G., *New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology*. Eur J Clin Invest, 2004. 34(12): p. 785-96.
- [229] Yan, S.F., et al., *Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond*. Circ Res, 2003. 93(12): p. 1159-69.
- [230] Young, B.A., et al., *Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity*. Kidney Int, 1995. 48(2): p. 439-48.
- [231] Yozai, K., et al., *Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions*. J Am Soc Nephrol, 2005. 16(11): p. 3326-38.
- [232] Yurchenco, P.D., S. Smirnov, and T. Mathus, *Analysis of basement membrane self-assembly and cellular interactions with native and recombinant glycoproteins*. Methods Cell Biol, 2002. 69: p. 111-44.
- [233] Zeisberg, M., et al., *Stage-specific action of matrix metalloproteinases influences progressive hereditary kidney disease*. PLoS Med, 2006. 3(4): p. e100.
- [234] Zhang, Y. and B.J. Rollins, *A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer*. Mol Cell Biol, 1995. 15(9): p. 4851-5.
- [235] Zheng, K., et al., *Canine X chromosome-linked hereditary nephritis: a genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the alpha 5 chain of collagen type IV*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(9): p. 3989-93.
- [236] Zhou, J., et al., *Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains*. J Biol Chem, 1994. 269(18): p. 13193-9.
- [237] Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. 414(6865): p. 782-7.
- [238] Zimmet, P.Z., *Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care*. Diabetologia, 1999. 42(5): p. 499-518.
- [239] Ziyadeh, F.N., *Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator*. J Am Soc Nephrol, 2004. 15 Suppl 1: p. S55-7.
- [240] Zlotnik, A., O. Yoshie, and H. Nomiyama, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006. 7(12): p. 243.
- [241] Zuker, M., *Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction*. Nucleic Acids Res, 2003. 31(13): p. 3406-15.

7 Abkürzungen

1K	Tiere nach Uninephrektomie (<i>1 kidney</i>)
2K	Tiere ohne Uninephrektomie/Sham-Operation (<i>2 kidneys</i>)
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym (<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ADAS	Autosomal-dominantes Alport Syndrom
AGE	<i>Advanced glycated end products</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ARAS	Autosomal-rezessives Alport Syndrom
AS	Alport Syndrom
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BM	Basalmembran
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
Ccl2	CC-Chemokin-Ligand 2
Ccr1	CC-Chemokin-Rezeptor 1
Ccr2	CC-Chemokin-Rezeptor 2
Ccr5	CC-Chemokin-Rezeptor 5
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
COL4A1-6	Kollagen Typ 4, α_{1-6} -Kette
CT	Schwellenwert bei der RT-PCR (<i>cycle threshold</i>)
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4
Da	Dalton
DARC	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Diabetische Nephropathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	allgemeine Schreibweise für Nukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELR-Motiv	Glutamat-Leucin-Arginin
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
et al.	et alii
EZM	Extrazelluläre Matrix
F4/80	Antigen für interstitielle Makrophagen
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	Farbstoff für die RT-PCR
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FSGS	Fokal-Segmentale Glomerulosklerose
g	Einheit der Schwerkraft auf der Erde (9,8 m/s ²)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid</i>
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
hpf	Gesichtsfeld (<i>high-power-field</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.v.	intravenös
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IgA	Immunglobulin A
IL	Interleukin
J774	Makrophagenzelllinie der Maus
kb	kilobase
KG	Körpergewicht
Ki	inhibitorische Konstante
Ki-67	Antigen für proliferierende Zellen
LCM	<i>laser capture microdissection</i>
LMM	<i>laser microbeam microdissection</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac2	Antigen für glomeruläre Makrophagen

MACS	<i>magnetic assisted cell sorting</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MECA-32	<i>mouse endothelial cell antigen</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nikotinsäureamiddinukleotidphosphat
NC	Nicht-kollagene Domäne (<i>noncollagenous domain</i>)
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD	<i>Nonobese Diabetic Mouse</i>
O.D.	Optische Dichte
ob/ob	Modell der hyperinsulinämischen Diabetes-Maus
PAS	Perjodsäure Schiff-Reagenz (<i>periodic acid schiff stain</i>)
PBND-Puffer	<i>PCR buffer with nonionic detergents</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PF4	Plättchenfaktor 4
PKH26	roter Fluoreszenzfarbstoff
PSGL1	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	<i>receptor for advanced glycolisation endproducts</i>
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
Real-time RT-PCR	Real-time Reverse-Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
RPMI	Zellkultur-Medium zur Anzucht humaner Leukozyten, entwickelt von <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	ribosomale RNA
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SSC	<i>saline-sodium citrate buffer</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
STZ	Streptozotocin

TAMRA	Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
Taq-Polymerase	Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
Th1	T-Helfer-Zelltyp 1
Th2	T-Helfer-Zelltyp 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UN	Uninephrektomie
UV	Ultraviolett
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIC	Farbstoff für die RT-PCR
vs.	versus
WT	Wildtyp
XLAS	X-Chromosomales Alport Syndrom

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sebastian Clauß
Anschrift	Neuherbergstraße 117, 80937 München
geboren am	09.05.1982 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1988 – 1990	Grundschule am Gotzinger Platz München
1991 – 1993	Grundschule Neumarkt Sankt Veit
1993 – 1994	Hauptschule Neumarkt Sankt Veit
1994 – 2002	Maximilian-von-Montgelas-Gymnasium Vilsbiburg
2002	Abitur (Note 1,5)

Ersatzdienst

08/2002 – 03/2003	Rettungsdiensthelfer beim Bayerischen Roten Kreuz
-------------------	---

Studium

seit 04/2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2005	1. Ärztliche Prüfung (Note 1,6)
02/2008 – 01/2009	Praktisches Jahr in München und Kapstadt
06/2009	2. Ärztliche Prüfung (Note 1,5)

Promotion

06/2006 – 11/2008	Promotion bei Herrn <i>Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders</i> , Abteilung für Medizinische Biochemie, Medizinische Poliklinik München
-------------------	---

Thema: Die Rolle der Mcp-1/Ccl2-abhängigen Rekrutierung von Makrophagen in der Progression der chronischen Niereninsuffizienz, dargestellt am Beispiel der diabetischen Nephropathie und des Alport-Syndroms in der Maus.

Beruflicher Werdegang

seit 09/2009	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern (Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Stefan Kääb)
--------------	---

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Ninichuk V., Kulkarni O., **Clauss S.**, Anders HJ., Tubular atrophy, interstitial fibrosis, and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. An accelerated model of advanced diabetic nephropathy. Eur J Med Res, 12(8):351-5, 2007.

Ninichuk V.*, **Clauss S.***, et. al., Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice. Am J Pathol, 172(3):628-37, 2008. **geteilte Erstautorenschaft*

Clauss S., Gross O., Kulkarni O., Avila A., Radomska E., Segerer S., Eulberg D., Klusmann S., Anders HJ., Ccl2/Mcp-1 blockade reduces glomerular and interstitial macrophages but does not ameliorate renal pathology in collagen4A3-deficient mice with autosomal recessive Alport nephropathy. J Pathol, 218(1):40-7, 2008

Lichtnekert J., Vielhauer V., Zecher D., Kulkarni O., **Clauss S.**, Segerer S., Hornung V., Mayadas TN., Beutler B., Akira S., Anders HJ., *Trif is not required for immune complex glomerulonephritis: Dying cells activate mesangial cells via Tlr2/Myd88 rather than Tlr3/Trif.* Am J Physiol Renal Physiol, 296(4):F867-74, 2009.

Abstracts

Clauss S., et al., Die spät begonnene Blockade von Ccl2/Mcp-1 mit RNA-Spiegelmeren verhindert die globale diabetische Glomerulosklerose und verbessert die GFR bei db/db Mäusen mit diabetischer Nephropathie, Nephrologisches Forum München, „Fellow's Night 2007“, 10. Juni 2007, München.

Clauss S., Späte Blockade von Mcp-1 mit dem pegylierten Spiegelmer mNOX-E36 verhindert die globale diabetische Glomerulosklerose und verbessert die GFR bei db/db Mäusen, 38. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie (GfN), 25. September 2007, München.

Clauss S., et. al., Die spät begonnene Blockade von Ccl2/Mcp-1 mit RNA-Spiegelmeren verhindert die globale Glomerulosklerose und verbessert die glomeruläre Filtrationsrate bei db/db Mäusen mit Typ 2 Diabetes, 114. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), 1. April 2008, Wiesbaden.

Preise

1. Preis im Rahmen der „Fellows' Night 2007“ des Nephrologischen Forums, 10. Juni 2007.

Förderung

10/2005 – 07/2009 Stipendium der *Friedrich-Naumann-Stiftung*

10/2006 – 06/2008 Förderung der Promotion im Rahmen des Promotionsstudiengangs „*Molekulare und systembiologische Medizin*“ durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät